

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
TEHNOLOOGIAINSTITUUT

**Elektrospinnitud antimikroobsete PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide *in vitro* testimine**

Magistritöö

30 EAP

Kadi Sagor

Juhendajad doktorant Mariliis Hinno, doktorant Kairi Tiirik, teadur Marta Putrinš

TARTU 2020

# Infoleht

## **Elektrospinnitud antimikroobsete PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide *in vitro* testimine**

Liigne antibiootikumide kasutamine on viinud patogeensete bakterite antibiootikumresistentsuse suurenemisele ning seetõttu on vaja vähendada antibiootikumide kasutamist. Süsteemse manustamise asenduseks töötatakse välja erinevaid alternatiive, millest üks on elektrospinnitud antimikroobsed haavakatted infitseerunud haava lokaalseks raviks. Farmakopöa juhiste puudumise tõttu uudsete ravimvormide testimiseks analüüsi käesolevas magistritöös erinevate raviaine vabanemisprofiilidega PCL/CAM ja PCL/PEO/CAM nanofiibermattide antimikroobsust bioreporteriga, *in vitro* ja *ex vivo* infektsioonimudelitega ning hinnati bakterite arvukust Alamar Blue värvi abil. Nimetatud katsed komplementeerivad farmakopöa kvaliteedikontrolli teste ning nende abil on võimalik hinnata nanofiibermattide bioloogilisi toimeid.

CERS kood: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia; T490 Biotehnoloogia; T410 Farmaatsiatooted ja nende tehnoloogiad

Märksõnad: antibiootikum, fluorestseeruvad valgud, bioreporter, elektrospinnimine, nanofiibermatid

## ***In vitro* testing of electrospun antimicrobial PCL and PCL/PEO nanofiber matrices**

Overuse of antibiotics has led to increased antibiotic resistance of pathogenic bacteria, making it necessary to reduce the use of antibiotics. Various alternatives to systemic administration are being developed, one of which is electrospun antimicrobial wound dressings to treat infected wounds. With the lack of appropriate protocols in pharmacopoeia for testing new treatment methods, this thesis assessed the antimicrobial property of PCL/CAM and PCL/PEO/CAM nanofiber mats using *in vitro* and *ex vivo* infection models and quantified bacteria using Alamar Blue dye. The aforementioned experiments complement quality control tests of pharmacopoeia and allow assessment of the biological activities of nanofiber mats.

CERCS code: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology; T490 Biotechnology; T410 Pharmaceuticals and related technologies

Keywords: antibiotic, fluorescent protein, bioreporter, electrospinning, nanofiber mats

# SISUKORD

Sisukord.....	3
Sissejuhatus .....	5
Kasutatud lühendid .....	6
1. Kirjanduse ülevaade .....	7
1.1. Antibiootikumid .....	7
1.1.1. Antibiootikumresistentsus .....	7
1.1.2. Antibiootikumide manustamine .....	9
1.2. Antibiootikumide tuvastamine .....	11
1.2.1. Bioreporterid.....	12
1.3. Elektrosppinnimine.....	13
1.3.1. Elektrosppinnitud nano- ja mikrofiibermatid biomeditsiinis .....	14
1.3.2. PCL, PCL/PEO fiibermatid .....	16
1.4. <i>In vitro</i> ja <i>ex vivo</i> infektsioonimudelid .....	17
1.4.1. Želatiin.....	18
1.4.2 <i>Ex vivo</i> infektsioonimudelid .....	19
2. Eksperimentaalosa .....	20
2.1. Töö eesmärgid .....	20
2.2. Materjal ja metoodika.....	20
2.2.1. Töös kasutatud bakterid.....	20
2.2.2. Töös kasutatud söötmed .....	21
2.2.3. Töös kasutatud plasmiid .....	21
2.2.4. Töös kasutatud elektrosppinnitud nano- ja mikrofiibermatid .....	22
2.2.5. Töös kasutatud želatiin ja seanahk .....	23
2.2.6. Nanofiibermattide testimine bioreporteriga.....	24
2.2.7. Nanofiibermattide testimine <i>in vitro</i> ja <i>ex vivo</i> infektsioonimudelitega.....	25
2.2.8. Nanofiibermattidele ja substraadile kinnitunud bakterite arvukuse määramine CFU meetodil .....	25

2.2.9. Nanofiibermattidele ja želatiinile kinnitunud bakterite arvukuse määramine Alamar Blue indikaatori abil .....	26
2.2.9. Andmete analüüs .....	28
2.3. Tulemused .....	28
2.3.1. Nanofiibermattide testimine bioreporteriga.....	28
2.3.2. Nanofiibermattide testimine <i>in vitro</i> ja <i>ex vivo</i> infektsioonimudelitega.....	31
2.4. Arutelu .....	36
Kokkuvõte .....	39
Summary.....	40
Kirjanduse loetelu.....	42
Kasutatud veebiaadressid .....	60
Lisa 1 .....	61
Lisa 2 .....	62
Lisa 3 .....	63
Lisa 4 .....	64
Lihtlitsents .....	65

## SISSEJUHATUS

Antibiootikumide liig- ja väärkasutamine on viinud bakterite resistentsuse suurenemisele. Resistentsuse vähendamiseks peab optimeerima antibiootikumide kasutamist ning harima inimesi väärkasutamise ohtudest.

Antibiootikumi on võimalik manustada patsiendile mitmel viisil, peamiselt jaotatakse need süsteemseks manustamiseks ning lokaalseks manustamiseks. Süsteemse toime vajalikkuse puudumise korral tuleks eelistada lokaalset manustamisviisi. Lokaalsel manustamisel on kõrgem antibiootikumi kontsentratsioon infektsioonipiirkonnas ning madalam mujal kehas. Seetõttu on kõrvaltoimete, mh antibiootikumresistentsuse tekke risk, teistes organismi piirkondades väiksem.

Järjest enam pööratakse biomeditsiinis tähelepanu elektrosppinnimisele. Elektrosppinnimisega saab luua väga erinevate omadustega materjale. Näiteks on võimalik luua maatrikseid, mis soodustavad kahjustatud kudede taastamist ning antibiootikumi sisaldavat haavakatet. Haavakatete juures on oluline materjali antimikroobsus, niiskuse säilitamine haavas, biosobivus ning katte kerge eemaldatavus. Neid ja paljusid teisi omadusi saab elektrosppinnimisega modifitseerida.

Hetkel puuduvad juhised taoliste haavakatete testimiseks farmakopöas. Töö autor testis klooramfenikooli sisaldava erineva toimeaine vabanemisprofiiliga elektrosppinnitud PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide antimikroobsust infektsioonimudelites ning testis nimetatud nanofiibermattide vabanemisprofiilide erinevusi bioreporteriga. Dissolutesstiga, farmakopöa klassikalise vesikeskkonnas raviaine vabanemise testiga, on näidatud, et PCL/PEO nanofiibermatist vabaneb raviaine palju kiiremini kui PCL matist, kuid sellised testid on ebapiisavad, et hinnata haavakattmaterjalide omadusi ja teha ennustusi nende käitumise kohta *in vivo* (Preem et al., 2017). Raviaine vabaneb PCL/PEO nanofiibermatist kiiremini kui PCL nanofiibermatist ka pooltahkes keskkonnas (Preem, Bock, et al., 2019), kuid käesolevas töös testitud infektsioonimudelites kahe mati antimikroobse toime vahel erinevusi ei leitud.

Antud töö on teostatud Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Tanel Tensoni juhitud uurimisgrupis koostöös Tartu Ülikooli Farmaatsia Instituudiga.

## KASUTATUD LÜHENDID

AMP – ampitsilliin

CAM – klooramfenikool

DMEM – Dulbecco poolt modifitseeritud Eagle'i sööde (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

FBS – veise loote seerum (*Fetal Bovine Serum*)

MBEC – minimaalne biofilmi hävitamise kontsentratsioon (*minimal biofilm eradication concentration*)

MIC – minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (*minimal inhibitory concentration*)

PCL – polükaprolaktoon (*polycaprolactone*)

PEO – polüetüleenoksiid (*polyethylene oxide*)

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon (*World Health Organization*)

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Antibiootikumid

Penitsilliini avastamine Alexander Flemingi poolt 1928. aastal (Fleming, 1929) oli nurgakiviks „antibiootikumide ajastu“ algusele, mis muutis bakteriaalsete haiguste ravimist. Antibiootikumid on erilised ravimid, sest nende sihtmärk pole inimese koed või nende sekreedid, vaid mikroorganismid (Gould ja Bal, 2013; Moser *et al.*, 2019). Lisaks sellele, et antibiootikumid on ravinud mitmeid bakteriaalseid haigusi, on neil olnud oluline roll keerukate operatsioonide juures ja transplantatsioonil, vastsündinute meditsiinis, vähipatsientide keemiaravis, et ennetada infektsioonide tekkimist (Guidos, 2011; Moser *et al.*, 2019). Antibiootikumide lai kasutamine on survestanud bakterite evolutsiooni resistentsuse suurendamiseks (Gould ja Bal, 2013).

### 1.1.1. Antibiootikumresistentsus

#### 1.1.1.1. Ühis- ja keskkondlikud probleemid

Väga oluline on antibiootikumidega seotud ohtude teemal inimesi harida. Alati ei võeta ravimit nii nagu arst ette näeb ning mõnes riigis on antibiootikumid käsimüügis. Samuti on probleemiks valede antibiootikumide ning valede annuste kasutamine, mis võib viia antibiootikumresistentsuse tekkeni. Näiteks liiga väikeste annuste korral suudab hävitatav bakter ellu jääda ning muutub resistentseks sellele antibiootikumile. (Laxminarayan *et al.*, 2013)

Veel on probleemiks antibiootikumide suur kogus keskkonnas, mis tuleneb antibiootikumide kasutamisest inimmeditsiinis, loomakasvatuses, veterinaarias (Boy-Roura *et al.*, 2018; Kraemer *et al.*, 2019; Levy ja Marshall, 2004; Van Boeckel *et al.*, 2015; Wise, 2002). Väga oluline negatiivne panus resistentsete bakterite levikul on just loomakasvatusel. Veelgi suurem kogus antibiootikume (umbes 70% kogu toodetud antibiootikumidest), kui inimeste raviks tarvis, kasutatakse loomakasvatuses haiguste ravimiseks, ennetamiseks ja kasvu kiirendamiseks. (Hollis ja Ahmed, 2013; *Should We Continue to Feed Antibiotics to Livestock?*, 2015; Van Boeckel *et al.*, 2015; Woolhouse *et al.*, 2015) Paljudes piirkondades on antibiootikumide kasutamine loomade kasvu kiirendamiseks keelatud, näiteks on näha, et Euroopas langeb veterinaarantibiootikumide müük (EMA/294674/2019). See ei tähenda aga, et seda ei tehta madala ja keskmise sissetulekuga riikides, näiteks Hiina, Brasiilia, Lõuna-Aafrika, sest nõudlus nendes piirkondades loomse valgu järele on kasvanud (Van Boeckel *et al.*, 2015).

On oluline olemasolevaid antibiootikume, nende kombinatsioone ja annuseid optimeerida ehk leida lühim maksimaalse efektiivsusega ravi kestus ja ravimite kombinatsioon, samuti välja töötada teisi ravimvorme. Hetkel lisandub turule väga vähe uusi antibiootikume, sest nende tõhusus usutakse olevat vaid lühiajaline ning väljaarendamise kulud ületavad saadavad tulud (Laxminarayan *et al.*, 2013).

#### **1.1.1.2. Bakterite omadused**

Resistentsus on bakteri geneetiline omadus, mis tekib kui bakter omandab selektiivse surve tõttu võime jääda ellu antibiootikumi sisaldavas keskkonnas. Näiteks suudavad bakterid muuta oma rakukesta, et vähendada antibiootikumi sisenemist rakku või seda hoopis rakust välja pumbata (Corona ja Martinez, 2013).

A. Fleming oli esimene, kes märkas, et tema avastatud penitsilliini suhtes võib tekkida mikroobil resistentsus, kui ravi kestab liiga lühikest aega või manustatakse liiga väikest kogust antibiootikumi (Laxminarayan *et al.*, 2013; *Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin*, 1945). Praegu kasvab resistentsus antibiootikumidele väga kiiresti. Mikroorganismidel on võime kiiresti muutuda resistentseks uutele sünteetilistele antibiootikumidele, mida pole varem eksisteerinud, ning ka neile, mida on modifitseeritud nii, et bakteri omandatud resistentsusmehhanism ei tööta. (MacDougall ja Polk, 2005) Samal ajal esineb ka looduslik resistentsus antibiootikumidele. On isoleeritud antibiootikumidele resistentseid baktereid inimesest puutumata koopast ning arktilisest mullast. Lisaks mikroobide poolt toodetud antibiootikumidele olid osad neist resistentsed ka poolsünteetilistele antibiootikumidele. (Bhullar *et al.*, 2012; Perron *et al.*, 2015; Perry *et al.*, 2016)

Lisaks geneetilisele omadusele võivad bakterid ka teistel põhjustel olla tolerantid antibiootikumidele. Seda nimetatakse fenotüübiliseks resistentsuseks. Näiteks märgati juba aastal 1944, et mittejagunevad *Staphylococcus aureus*-e rakud ei ole tundlikud penitsilliinile (Lee *et al.*, 1944). Praeguseks on kindlaks tehtud, et tundlikkus antibiootikumile mittejagunemise ajal sõltub antibiootikumi tüübist (Corona ja Martinez, 2013; Levin ja Rozen, 2006).

##### **1.1.1.2.1 Biofilm**

Üheks fenotüübilise resistentsuse näiteks on biofilm (Corona ja Martinez, 2013).

Looduslikus keskkonnas elavad bakterid enamasti pinnale kinnitunult ehk biofilmis, moodustades hulgakesi agregate. Üksikud bakterid toodavad limajat rakuvälist ainet



(maatriks), mis seob bakterid üheks biofilmiks. Maatriksi peamised komponendid on vesi, polüsahhariidid ja valgud. Biofilm pakub üksikbakterile kaitset ebasoodsate keskkonnatingimuste eest, näiteks kuivamine või antibiootikumid. (Branda *et al.*, 2005; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Hall-Stoodley ja Stoodley, 2009; Percival *et al.*, 2012)

Biofilm on suureks probleemiks meditsiinis. Näiteks võib haavainfektsiooni korral patogeenne bakter moodustada haava pinnale biofilmi. Antibiootikumravi ei pruugi olla tõhus, sest biofilmis ei jõua ravim kõikide bakteriteni letaalses kontsentratsioonis. Samal ajal võib biofilmi maatriksis olla pidev subletaalne antibiootikumi kontsentratsioon ning patogeen võib muutuda sellele ravimile resistentseks. (Branda *et al.*, 2005; Corona ja Martinez, 2013; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Hall-Stoodley ja Stoodley, 2009)

### **1.1.2. Antibiootikumide manustamine**

Ravi antibiootikumidega on püütud optimeerida, et vähendada toksilisust patsiendile ning vältida resistentsuse teket mikroobil (Møller Gundersen *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2019; Yilmaz ja Özcengiz, 2017). Väga oluline on resistentsuse vähendamiseks kasutada bakterile mõjuvat antibiootikumi, korrektset doosi ning ravi kestus peab olema piisav (Olofsson ja Cars, 2007).

Antibiootikume võib jagada kahte rühma: laia toimespektriga ja kitsa toimespektriga. Laia toimespektriga antibiootikumid mõjuvad paljudele bakteriliikidele. Neid kasutatakse kui ei teata patogeeni liiki, näiteks kiiret reageerimist vajava sepsise korral enne haigustekitaja kindlaksmääramist või profülaktikaks. Kitsa toimespektriga antibiootikumid on konkreetse bakteriliigi või perekonna vastased. Neid kasutatakse, kui on teada infektsiooni põhjustaja. (Melandar *et al.*, 2017)

#### **1.1.2.1. Antibiootikumide manustamise viisid**

Antibiootikumide üks manustamise viise on süsteemne manustamine. Süsteemse manustamise korral jõuab ravim vereringesse ning sealt edasi üle kogu keha. Levinuimad süsteemse manustamise viisid on suukaudne ehk peroraalne või süstimine ehk parenteraalne (intravenoosne, intramuskulaarne, subkutaanne). Samuti võib süsteemselt manustada ravimit rektaalse tee kaudu, seda näiteks kui patsiendil esineb vastunäidustusi ravimi suukaudsel manustamisel (oksendamine, kõhuvalud). (Bergogne-Bérézin ja Bryskier, 1999) Veel saab süsteemselt ravimit manustada transdermaalselt ehk läbi naha. Nahale pannakse plaastritaoline kleepuv ese, mis väljutab ravimit läbi naha organismi, kuid see pole veel väga levinud (Kurmi *et al.*, 2017). Antibiootikumide rektaalse ja transdermaalse manustamise

takistuseks võib olla vähene süsteemne biosaadavus (Bergogne-Bérézin ja Bryskier, 1999; Kurmi *et al.*, 2017).

Teine levinud manustamisviis on lokaalne manustamine, mille korral manustatakse antibiootikumi otse infektsioonipiirkonda, kus raviaine kontsentratsioon on kõrge ning samas jääb kontsentratsioon vereringes madalaks, vähendades seega süsteemsete kõrvaltoimete tekkimise riski (Marson *et al.*, 2018). Lokaalselt saab manustada erinevaid antibiootikumi sisaldavaid ravimvorme, näiteks kreeme, geele aga ka silmatilku ja silmasalve (Ravimiregister).

Tabelis 1 on võrreldud süsteemse ja lokaalse manustamise eeliseid ja puudusi (Tabel 1).

**Tabel 1. Võrdlev tabel süsteemse ja lokaalse antibiootikumi manustamise kohta. Kohandatud (Jepsen ja Jepsen, 2016).**

	Süsteemne manustamine	Lokaalne manustamine
<b>Ravimi jaotumine</b>	Laialdane jaotumine kehas	Kitsas toimepiirkond
<b>Ravimi kontsentratsioon</b>	Erinev kontsentratsioon keha eri piirkondades	Kõrge kontsentratsioon manustatud kohas, madalam mujal kehas
<b>Ravi potentsiaal</b>	Võib rohkem mõjutada keha eri piirkondades olevaid mikroorganisme	Võib rohkem mõjutada lokaalselt olevaid mikroorganisme, näiteks biofilmiga seotud baktereid
<b>Probleemid</b>	Süsteemsed kõrvaltoimed	Võib tekkida uus infektsioon mujal piirkonnas, mida ei ravitud; lokaalsed kõrvaltoimed
<b>Kliinilised piirangud</b>	Vajab patsiendi valmisolekut, näiteks tableti neelamisel	Infektsioon peab olema lokaalne

#### 1.1.2.2. Antibiootikumravi kestus

Antibiootikumide, mille toime on ajast sõltuv, manustamist peaks optimeerima, et vereseerumis oleks kõrgem kontsentratsioon antibiootikumi kui on patogeenile mõjuv minimaalne inhibeeriv kontsentratsioon (*minimum inhibitory concentration* – MIC). Ajast sõltuvate antibiootikumide korral kontsentratsiooni tõstmisel bakterite suremus ei suurene. (Burton *et al.*, 2006)

Kontsentratsioonist sõltuva toimega antibiootikume peaks manustama optimeerides kontsentratsiooni maksimumi MIC-i suhtes. Kontsentratsiooni tõstmisel bakterite suremus suureneb. (Burton *et al.*, 2006)

Süsteemse antibiootikumravi kestus sõltub haigusest ning konkreetsest patogeenist, patsiendi vanusest ja üldisest tervislikust seisundist ning haiguse raskusest. Hiljutisest WHO (Maailma Terviseorganisatsioon – *World Health Organization*) raportist võib leida näiteks, et kopsupõletiku korral võib ravi kestus lastel olla 5-10 päeva või raskemal juhul lausa kuni 28 päeva. Täiskasvanute puhul on ravi kestus tavaliselt kuni nädal või raskemal juhul kuni 3 nädalat. (Pezzani *et al.*)

Lokaalse antibiootikumraviga ravitakse näiteks aknet. Ühes uuringus (12 nädalat) uuriti lisaks tavalisele akne ravile (süsteemne või lokaalne antibiootikumravi või mõni muu ravi) veel kahe erineva lokaalse antibiootikumravi efektiivsust, kuid tulemused jäid samale tasemele nagu tavalise akne ravi puhul (Khorvash *et al.*, 2013). Veel ravitakse lokaalse antibiootikumraviga infitseerunud haava, kuid selle ravi kestus sõltub haavast. Samal ajal on seatud kahtluse alla haava lokaalse ravi mõistlikkus. Pole veenvaid tõendeid, sellise ravi efektiivsuse kohta, pigem on näidatud, et rutiinne lokaalne haavaravi antibiootikumidega võib soodustada resistentsete bakterite kolonisatsiooni. (Percival *et al.*, 2012; Siddiqui ja Bernstein, 2010)

Järjest enam räägitakse antibiootikumiravi kestuse optimeerimisest, et vähendada resistentsuse teket antibiootikumidele. Teisisõnu püütakse leida võimalikult optimaalne aeg ja ravimi kontsentratsioon, et ravi oleks efektiivne ja infektsioon ei taastuks, samuti on oluline ohutus patsiendile (File *et al.*, 2007; Møller Gundersen *et al.*, 2019; Spellberg, 2016; Zhao *et al.*, 2016; Pezzani *et al.*).

## **1.2. Antibiootikumide tuvastamine**

Antibiootikume leidub ümbritsevas keskkonnas (näiteks põhjavesi, muld) järjest enam ning seetõttu võib levida antibiootikumresistentsus ka mujal kui nakatunud inimese kehas. Antibiootikume toodavad mikroorganismid ise ning neid on leidunud madalas kontsentratsioonis keskkonnas, kuid inimtegevuse tagajärjel on see kontsentratsioon suuresti kasvanud. (Ashbolt Nicholas J. *et al.*, 2013; Larsson *et al.*, 2007; Pawlowski *et al.*, 2016). Näiteks antibiootikumidega saastunud põhjavett juues on inimkehas pidevalt madal antibiootikumide tase, mistõttu võivad mikroobid kehas muutuda sellele antibiootikumile tundetuks (Boy-Roura *et al.*, 2018). Samuti võib antibiootikume leiduda loomset päritolu

toidus, kuna neid kasutatakse näiteks loomade kasvu kiirendamiseks. Seetõttu on vaja vahendeid, et tuvastada antibiootikumide olemasolu erinevates keskkondades (Munteanu *et al.*, 2018).

Antibiootikume saab tuvastada keskkonnast erinevate vahenditega – nii füüsikaliste kui bioloogiliste meetoditega. Palju on kasutatud selleks kromatograafiat, sest see on tundlik ja automatiseeritud, kuid vajab eraldi masinat ning detektoriks on vaja lisainstrumente, näiteks mass-spektroskoopi või fluoromeetrit (Mokh *et al.*, 2017; Neves *et al.*, 2017; Pérez *et al.*, 2017). Samuti saab antibiootikume keskkonnast tuvastada elektroforeesi abil näiteks kapillaar-elektroforeesil (Dai *et al.*, 2017) või mikrokiip-elektroforeesil (Y. Wang *et al.*, 2017).

### **1.2.1. Bioreporterid**

Lisaks eelpool mainitud võtetele on võimalik kasutada antibiootikumi tuvastamiseks ka elusorganisme. Bioreporterid on mikroorganismid, rakud või rakuliinid, mis on geneetiliselt muudetud ja selle tõttu suudavad signaliseerida keskkonnast silmale nähtamatut signaali (J. R. van der Meer ja Belkin, 2010). Bioreporterid on kiire kasvuga, odavad, neid on kerge käsitleda ja geneetiliselt muuta ning need signaliseerivad seda, mis avaldab mõju elusale rakule (Belkin, 2003; Harms *et al.*, 2006; J. R. V. D. Meer *et al.*, 2004). Bioreporterid võivad olla väga spetsiifilised, näiteks tundlikud kindlale kemikaalile, või väga laia spetsiifikaga ehk signaliseerivad keerukas lahuses mistahes stressi korral. Viimasel juhul tuleks konkreetse stressori tuvastamiseks kasutada spetsiifilisemaid vahendeid (Xu *et al.*, 2013). Bioreporterid võivad olla väga tundlikud tuvastavamaks väga madala kontsentratsiooniga kemikaale keskkonnast (Harms *et al.*, 2006; J. R. V. D. Meer *et al.*, 2004; Roointan *et al.*, 2015; J. R. van der Meer ja Belkin, 2010). Bioreportereid on võimalik töötada välja ka antibiootikumi koguse kvantitatiivseks määramiseks. Signaaliks võib olla kvantitatiivselt mõõdetav signaal, näiteks värvusreaktsioon, fluorestsents või bioluminestsents. (Melamed *et al.*, 2012) Veel on võimalik bioreporterite abil jälgida bakterite signaale *in vitro* ja *in vivo* infektsioonimudelites (Yanwen Sun *et al.*, 2012; X. Wang *et al.*, 2016). Bioreporterite negatiivse poole pealt võiks välja tuua nende muteerumisvõime kuna tegemist on elusorganismidega (Harms *et al.*, 2006). Seetõttu on raskendatud ka nende turuletoomine, sest riikide seadusandlus ei pruugi võimaldada geneetiliselt muudetud organisme müüa ja kasutada (J. R. van der Meer ja Belkin, 2010). Limiteerivaks faktoriks bioreporterite kasutamisel antibiootikumide tuvastamiseks on reporterite kui elusorganismide liigne tundlikkus letaalsele antibiootikumide kontsentratsioonidele (Melamed *et al.*, 2012).

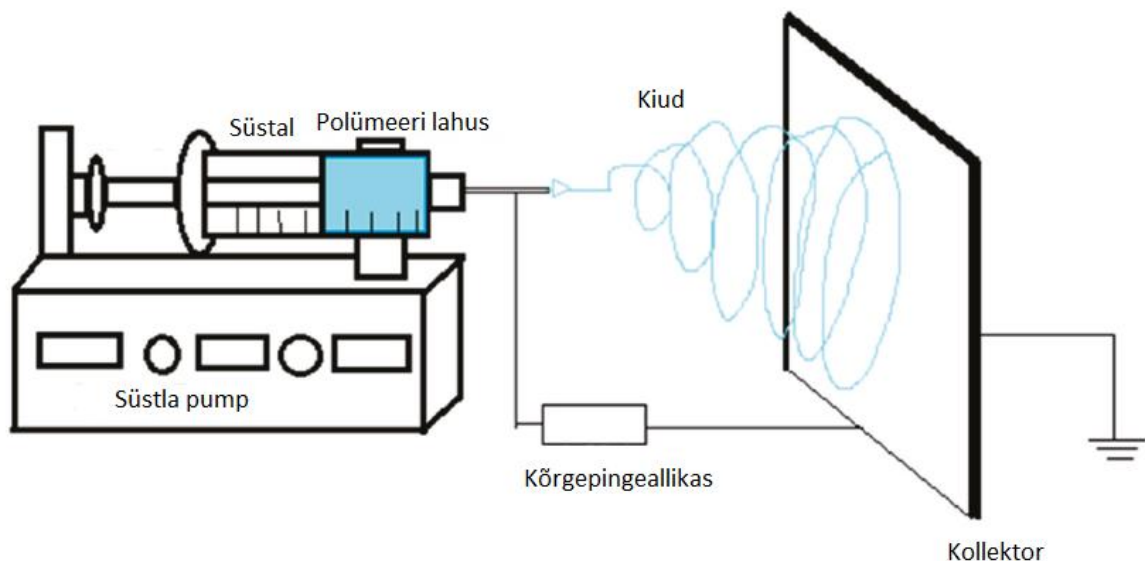
### 1.3. Elektrosppinnimine

Traditsiooniliselt on antibiootikumid manustamiseks süstelahuses ja tabletis, aga ka kreemis ning silmatilkades. Tänapäeval aga luuakse uudseid ravimkandureid. Näiteks võib antibiootikum olla elektrosppinnitult väikese diameetriga nanofiiberkius.

Elektrosppinnimisega luuakse elektrivälja abil väga peenikese (kaks nanomeetrit kuni mõnikümmend mikromeetrit) kiuga materjale. Elektrivälja kasutamiseta on saadavad kiud jämedamad. Spinnida saab nii looduslikke kui sünteetilisi polümeere. (Ahn *et al.*, 2006; Bhardwaj ja Kundu, 2010; Hunley ja Long, 2008; Reneker ja Yarin, 2008; Weng ja Xie, 2015)

Nano- ja mikrofiibermati spinnimiseks on vaja vooluallikat, spinnitavat materjali ja selle pihustajat (süstal) ning fiibri kollektorit (Joonis 1) (Bhattarai *et al.*, 2018). Polümeer lahustatakse ning pannakse süstlasse. Pumba abil väljutatakse lahus läbi peenikese kõrgepingeallikaga ühendatud metallist nõela (spinneretti). Elektrivälja toimel moodustuvad lahusest peenikesed kiud, mis kogutakse metallist maandatud kollektorile. (Burgess *et al.*, 2018; Haider *et al.*, 2018)

Elektrosppinnimise juures on olulised kasutatavad parameetrid, mis hõlmavad endas: spinnimiseks kasutatav pinge, kollektori kaugus spinneretist, voolu kiirus, spinnereti diameeter. Samuti on oluline kasutatav lahusti, polümeeri kontsentratsioon, lahuse viskoossus ja elektrijuhtivus. Veel on oluline spinnimiskeskonna niiskus ning temperatuur. (Haider *et al.*, 2018)



Joonis 1. Elektrosppinnimise aparatuur. Kohandatud (Bhattarai *et al.*, 2018).

### **1.3.1. Elektrospinnitud nano- ja mikrofiibermatid biomeditsiinis**

Biomeditsiinis on võimalik kasutada elektrospinnitud nanofiibreid väga mitmeti. Järgnevalt on toodud mõned näited kasutusalaadest.

Lai kasutusala on kahjustunud kudede taastamine. Nanofiibermaatriksiga saab luua soodsa keskkonna rakkudele kinnitumiseks ning koe moodustamiseks. Veelgi enam, maatriksisse saab lisada koe moodustamiseks vajalikke komponente, näiteks kasvufaktoreid ja signaalmolekule. Seejuures peab jälgima, et maatriksi poorid oleksid piisavalt suured rakkude infiltreerumiseks ja kolmemõõtmelise struktuuri moodustamiseks. (Haider *et al.*, 2018; Weng ja Xie, 2015)

Nanofiibermatte on võimalik arendada ka biosensoriks, mis tuvastab gaase või biomolekule. Näiteks on tehtud biosensorid, mis tuvastavad ureat patsiendist. (Sawicka *et al.*, 2005; W. Wang *et al.*, 2009; Weng ja Xie, 2015) Samuti on tehtud elektrospinnitud nanofiibritest biosensor, mis suudab tuvastada tsirkuleerivaid kasvajakarakke (Zhang *et al.*, 2012).

Elektrospinnitud nanofiibreid on kasutatud haava lokaalseks raviks, sest spinnimise käigus saab fiibermatti hõlpsalt integreerida ravimit ning bioloogilisi molekule (näiteks rakuvälises maatriksis olevaid molekule). Ravi efektiivsuse suurendamiseks on võimalik konstrueerida nanofiiber, mille ravimi või bioloogilise molekuli vabanemist on võimalik modifitseerida. (Sill ja von Recum, 2008; Weng ja Xie, 2015) Samuti on võimalik panna nanofiibrisse mitut erinevat ravimit (Haider *et al.*, 2018).

#### **1.3.1.1. Haavad ja uudsed materjalid haavaravis**

Haavad on trauma tagajärjel tekkinud epiteelkoe katkestused. Haavu saab klassifitseerida mitmeti, peamiselt tehakse seda haava kestvuse järgi (akuutne ning krooniline) ning haava sügavuse (marrastus või sügavam haav). Akuutsed haavad paranevad enamasti kolme nädalaga, seevastu kroonilised haavandid püsivad enamasti üle nelja nädala (Siddiqui ja Bernstein, 2010). Veel saab haava klassifitseerida paranemise järgi, kas haav suudab ise paraneda või mitte. Ka saab liigitada haavu puhtusastme järgi (aseptiline või saastunud). Põletikulise ehk infitseerunud haava korral on alati oht üldinfektsiooniks. (Kogermann, 2018; Korting *et al.*, 2011)

Haava paranemisel räägitakse neljast faasist: hemostaasi faas, põletikufaas, kasvufaas ja küpsemisfaas (McLister *et al.*, 2016). Hemostaasi faasis on oluline peatada verejooks. Teises faasis on väga oluline saada haav puhtaks, sest enne ei alga haava kokku kasvamine kui infektsioon on puhastatud (Siddiqui ja Bernstein, 2010). Kasvufaasi lõpuks sulgub haav ehk

epiteliseerub. Kõpsemisfaasis algab kudede taastamine, mis võib kesta ka mitu aastat. (Kogermann, 2018)

Vananeva rahvastiku, diabeedi ja ülekaalu tõttu on krooniliste haavandite esinemine muutumas järjest sagedasemaks ning see koormab tervishoiusüsteemi (Sen *et al.*, 2009). Krooniliste haavandite korral ei ole keha suutnud haava ise parandada (Korting *et al.*, 2011; Lazarus *et al.*, 1994). Näiteks ei saa haav paraneda infektsiooni olemasolul, kuid haav on soodus keskkond bakterikasvaks (McLister *et al.*, 2016; Percival *et al.*, 2012; Siddiqui ja Bernstein, 2010). Bakterid loovad haava pinnale kiiresti biofilmi ning edasisesks haava paranemiseks on vaja tõhusamaid meetodeid kui lihtsalt puhastamine (Percival *et al.*, 2012). Mida kauem on haavand põletikus olnud, seda suurem on mikroobide mitmekesisus haavas (Siddiqui ja Bernstein, 2010). Sagedasemad bakteriliigid haavas on *Staphylococcus aureus* ja *Pseudomonas aeruginosa*, aga ka *Escherichia coli* ja *Staphylococcus epidermidis* (Bessa *et al.*, 2015; Méric *et al.*, 2018; Percival *et al.*, 2012; Siddiqui ja Bernstein, 2010). Biofilm kaitseb patogeeni nii ravimite kui ka mehhaanilise häirimise eest (Percival *et al.*, 2012). Geeniekspressiooni muutmise kaudu ning aeglasema kasvu tõttu on biofilmis kasvavad bakterid tundetumad antibiootikumidele, lisaks võivad tekkida persistorid, mis on väike osa suurest populatsioonist mingil põhjusel kõrget kontsentratsiooni antibiootikumi taluvad bakterid (Balaban *et al.*, 2019; Corona ja Martinez, 2013; Siddiqui ja Bernstein, 2010). Konkreetsete patogeenide kindlakstegemine on keerukas, kuna naha pinnal elab palju erinevaid mikroobe (Percival *et al.*, 2012). Kroonilisi haavandeid ravitakse nii süsteemsete antibiootikumidega, mille efektiivsuse kohta pole tugevaid tõendeid, kui lokaalsete antimikroobsete ühenditega, kuid lokaalsed preparaadid võivad soodustada resistentsete bakterite kolonisatsiooni ning tekitada lokaalseid nahaärritusi (Percival *et al.*, 2012; Siddiqui ja Bernstein, 2010).

Haavaravis on aastate jooksul palju muutunud. Varasem arusaam, et haav peab saama palju tuulutada, on ümber lükatud, nüüdseks on teada, et haav paraneb paremini niiskes keskkonnas, kuid niiske keskkond võib olla soodus infektsiooni tekkeks (Broussard ja Powers, 2013; Korting *et al.*, 2011; Wiechula, 2003). Varasemalt kasutusel olnud sidemed ja marlitükikesed teibi küljes on asendunud uudsete haavakatetega (Broussard ja Powers, 2013; Queen *et al.*, 2004). Näiteks on ennast tõestanud hüdrogeeli sisaldavad haavakatted, mis tekitavad ka kuivas või kuivemapoolses haavas niiske keskkonna, haavaeritisega kokku puutudes muutub tahke aine geeljaks, mis soodustab haava paranemist. Samuti on neil jahutav efekt, et vähendada valulikkust. Hüdrogeelid ei sobi liigse eritisega haavadele, sest liigne niiskus ei aurustu materjalist. Suure eritisega haavade jaoks on head väga imava toimega

hüdrofiibrid. (Broussard ja Powers, 2013; Queen *et al.*, 2004; Rheinecker, 1995) On jõutud arusaamisele, et iga haava tuleb vaadelda eraldi ning vastavalt sellele valida ka raviskeem, seetõttu pole olemas ühte, kõigile haavadele sobivat, raviplaani (Broussard ja Powers, 2013; Kogermann, 2018).

Veelgi uudsemad, reaalses maailmas jälgitavad diagnostikavahendid, pole veel patsientide kodudesse jõudnud. Näiteks püütakse arendada nutikaid materjale, mis reageerivad haavakeskkonna muutustele, näiteks pH, niiskus, temperatuur ja bakterite arvukus. (Kogermann, 2018; McLister *et al.*, 2016)

#### **1.3.1.2. Elektrosponnitud haavakatted**

Igal aastal vajavad põletuse, elektrilöögi, kemikaalide, UV-kiirguse või haiguse tõttu miljonid inimesed naha siirdamist. Sügavamate kahjustuste korral on kasutatud siirdamiseks nahka endalt (autoloogne siirdamine) ning teiselt inimeselt (allogeenne siirdamine) või teiselt liigilt (ksenogeenne siirdamine), sest näiteks laialdaselt põletada saanud inimeselt ei ole võtta nahka siirdamiseks. Need võtted on aga kallid ning samuti võib allogreenselt ja ksenogeenselt siirdatud nahk tekitada ebasoovitavat immuunvastust ning siirdamise käigus võib patsiendi seisund ajutiselt muutuda kehvemaks. (Albritton *et al.*, 2014; Halim *et al.*, 2010; MacNeil, 2007; Seal *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2008) Üks viis, kuidas probleemseid haavu ravida, on teha kunstlikke naha-asendusi. Nanofiibermaatriksid on hetkel väga paljulubavad uue nahakoe loomiseks. Heade omaduste hulgast võib leida nanofiibermati õheduse, suure eripinna, naha naturaalsele rakuvälisele maatriksile sarnase morfoloogia, mis soodustab rakkude adhesiooni, migratsiooni ja proliferatsiooni (Haider *et al.*, 2018; Jayakumar *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2008). Samuti on oluline, et matid soodustaksid kroonilise või akuutse infektsiooni ravimist, hoiaksid niiskuse tasakaalu ning imaksid haavast vedelikke (Jayakumar *et al.*, 2011; Khil *et al.*, 2003). Nanofiibermaatriksidel on väga erineva suurusega poorid, mis kaitsevad haava väliskeskkonnast tulevate mikroobide eest, kuid samas võimaldavad gaasivahetust (Jayakumar *et al.*, 2011; Khil *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2008). Elektrosponnitud haavakatted peavad olema mittetoksilised, mitteallergeensed, mittekleepuvad ning neid peaks saama eemaldada suurema vaevata, uut traumat tekitamata (Haider *et al.*, 2018; Jayakumar *et al.*, 2011).

#### **1.3.2. PCL, PCL/PEO fiibermatid**

PCL ehk polükaprolaktoon (*polycaprolactone*) on hüdrofoobne biolagunev sünteetiline polümeer (Ji *et al.*, 2014). Teadlased on selle vastu huvi tundud, sest PCL polümeer on odav, tugev, paindlik, ning bioloogiliselt sobiv (McClure *et al.*, 2010; Woodruff ja Huttmacher,



2010). Elektropsinnitud PCL matid on sarnased ekstratsellulaarsele maatriksile ning seetõttu kasutatakse neid kudede taasloomisel (Ji *et al.*, 2014). PCL maatriks on poorne väikeste molekulide suhtes, mittetoksiline ning lagunemisel ei muuda see keskkonna pH-d (Radisavljevic *et al.*, 2018).

PEO ehk polüetüleenoksiid (*polyethylene oxide*) on hüdrofiilne biolagunev sünteetiline polümeer, mida samuti kasutatakse meditsiinis (Berri *et al.*, 2018; Griffith, 2000). PEO on mittetoksiline, ei tekita immuunreaktsiooni ega interakteeru valkudega ning ei häiri rakutalitlust (Berri *et al.*, 2018; Nagaoka ja Nakao, 1990).

Segades PCL ja PEO polümeeri saadakse veelgi paremini modifitseeritavaid nanofiibermatte, näiteks lokaalseks haavaraviks haavakatete näol või kudede taastamise soodustamiseks (Eskitoros-Togay *et al.*, 2018, 2019; Li *et al.*, 2015; Preem, Bock, *et al.*, 2019; Preem *et al.*, 2017; Rubert *et al.*, 2014).

#### **1.4. *In vitro* ja *ex vivo* infektsioonimudelid**

Uute haavakatete turuletoomiseks on vaja testida nende toimet. Farmakopöas, farmatseutiliste preparaatide kvaliteedinõuete kogumikus, puuduvad juhised uudsete, antimikroobset ainet sisaldava ning seda modifitseeritult vabastavate, haavakatete efektiivsuse kinnitamiseks ning võrdlemiseks. Tavapärast testitakse toimeaine vabanemist vesikeskkonnas, mis on väga erinev haavakeskkonnast ning seetõttu on vaja taoliste haavakatete testimiseks luua uusi testmudeleid.

Väga levinud viis haavakatete testimiseks on *in vivo* infektsioonikatsed loomamudelil. Katseloomale tekitatakse haav, näiteks põletushaav kuuma esemega, mis infitseeritakse patogeeniga ja seejärel testitakse loodavat haavakatet, kuid näiteks kontroll-loomi ei ravita ning hiljem need loomad tihtipeale hukatakse (Davis *et al.*, 2018; Setooni *et al.*, 2018; C.-H. Wang *et al.*, 2017). Loomkatsed on väga ressursikulukad ning eetilise seisukohalt keerukad. Selleks, et vähendada loomkatsete tegemise vajadust, luuakse *in vitro* infektsioonimudeleid.

*In vitro* infektsioonimudeleid on väga palju erinevaid, kuid laias laastus jagatakse need kahte gruppi – staatilised või dünaamilised. Staatilistes mudelites kasvatatakse baktereid söötmes, mida ei vahetata või vahetatakse harva, vastupidiselt dünaamilistele mudelitele, kus on tagatud pidev uue steriilse söötme pealevool ning vana söötme ära uhtumine. Staatiliste mudelite korral kasutatakse teadustöös kõige enam agar- ja mikrotiiterplaate, sest katsed nendega on odavad ja lihtsad (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019). Pooltahkele toitaineterikkale substraadile (agarile) külvatakse tihe bakterikultuur, mille peale asetatakse uuritav materjal,

näiteks antibiootikum või haavakate, ning jälgitakse inhibitsiooniringide teket; samuti saab agarplaadi abil uurida mikroorganismide vastastikust mõju (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019; Bradshaw, 2011; Preem, Bock, *et al.*, 2019; Thorn *et al.*, 2005). Mikrotiiterplaadid võimaldavad uurida samaaegselt paljusid erinevaid proove. (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019) Üks variant biofilmi uurimiseks mikrotiiterplaadi abil on kasutada kaant, mille küljes on iga kannu jaoks väike pulk, mille külge saab biofilm kinnituda. Kui biofilm on moodustunud, saab tõsta kaane uuele plaadile, mille kannus on näiteks erineva kontsentratsiooniga antibiootikumid. (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019; Ceri *et al.*, 1999; Olivares *et al.*, 2020) Selle eeliseks on efektiivsem ajakasutus, väiksem saastuse oht, lihtsam käsitletavus (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019; Ceri *et al.*, 1999).

Dünaamilised mudelid jälgendavad paremini reaalseid tingimusi, näiteks kui uuritakse haavainfektsioone, sest organism on dünaamiline süsteem. Läbivoolukultuurides kasvatatakse baktereid näiteks torudel või membraanidel. Värske sööde tuleb pidevalt ühtlase vooluna ja biofilm kasvab söötme-õhu piiril. Biofilmi reaktorites võib lisaks söötme vahetamisele toimuda ka erinevat tüüpi segamist ning bakterid võivad kasvada erinevatel materjalidel, näiteks plastiktorudel. (Bahamondez-Canas *et al.*, 2019)

Eelpool mainitud süsteemid ei ole väga lähedased inimese haavale. Seetõttu on loodud haavale sarnasemaid mudeleid, näiteks kasvatatakse biofilm üles kollageeni maatriksis koos seerumi valkudega või marli tükikeses, mis asetatakse agarile või mikrotiiterplaadile (Bowler ja Parsons, 2016; Melo *et al.*, 2019; Werthén *et al.*, 2010). Veel on loodud näiteks kroonilise haava jälgendamiseks erilisi söötmeid ning kambrikest biofilmi uurimiseks ning antimikroobse haavakatte testimiseks (Percival *et al.*, 2008; Yan Sun *et al.*, 2008; Thorn ja Greenman, 2009). Veelgi sarnasemate tingimuste tarvis on loodud nahka jälgendavad substraadid haavainfektsiooni uurimiseks (Haisma *et al.*, 2013). Tänapäevaseid tehnoloogiaid kasutades on loodud kiipelundeid, näiteks nahka jälgendavaid kiip-süsteeme. Neis suudetakse kasvatada inimese nahale väga lähedaste omadustega kudesid, milleni saab juhtida toitaineid ja muid vedelikke või gaase ning ka ära juhtida jääkaineid. (Sriram *et al.*, 2018; Wufuer *et al.*, 2016)

#### **1.4.1. Želatiin**

Želatiini kasutatakse alternatiivse substraadina *in vitro* haavamudelites (Asghari *et al.*, 2016; Jahanshahi *et al.*, 2020). Želatiin koosneb valkudest ja peptiididest, mis saadakse loomse kollageeni osalisel hüdrolüüsimisel, mistõttu on želatiin biosobiv ja sisaldab peamisi naha rakuvälise maatriksi komponente (Gómez-Guillén *et al.*, 2011). Lisaks on see odav kasutada,

plastiline, antigeenivaba ning seda juba kasutatakse biomeditsiinis ning farmaatsias (Jahanshahi *et al.*, 2020; Kathuria *et al.*, 2009).

### **1.4.2 *Ex vivo* infektsioonimudelid**

Haavakatete testimiseks on loodud veelgi tõelisemaid mudeleid. On võimalik kasutada ka mõne looma nahka, näiteks sea nahka, ning sellel on mitmeid eeliseid. Seanahk on võrreldes teiste imetajate nahaga morfoloogiliselt ja funktsionaalselt kõige sarnasem inimese nahale. Teiseks on sea nahka kerge saada ning ka külmutada pikema perioodi vältel. Kolmandaks saab seanaha haavamudelit inokuleerida erinevate inimese naha patogeenidega ning jälgida infektsiooni teket ning haavakatte või muu ravimi mõju infektsiooni mahasurumiseks. (Rubinchik ja Pasetka, 2010)

Kõige parem oleks loomulikult testida haavakatet päris haava peal, kuid eetilistel kaalutlustel on see raskendatud. Sellele vaatamata on võimalik kasutada mudelites ka inimese nahka. Schaudinn ja kolleegid kogusid tervetelt vabatahtlikelt kosmeetilisel operatsioonil eemaldatud naha ning inokuleerisid selle *Pseudomonas aeruginosa*-ga ning jälgisid infektsiooni kulgu. 20 tundi pärast inokulatsiooni lisasid nad antibiootikumi ning jälgisid selle mõju infektsioonile. Selline mudel on väga oluline täitmaks tühimikku loomkatsete ning inimkatsete vahel. Uuringust selgus, et laboritingimustel seatud minimaalne biofilmi hävitamise kontsentratsioon (MBEC – *minimal biofilm eradication concentration*) ei toiminud päris nahal sama efektiivselt kui mikrotiiterplaadil. (Schaudinn *et al.*, 2017) See katse näitab väga selgelt, et on vaja luua inimese nahale võimalikult sarnaseid mudeleid.

## 2. EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida erinevate omadustega elektrosppinnitud nanofiibermattide omadusi haavakatete kontekstis. Eelkõige pöörati tähelepanu antibakteriaalsetele omadustele.

Uuritava materjalina kasutati TÜ Farmaatsia Instituudis väljatöötatud erineva vabanemisprofiiliga klooramfenikooli sisaldavaid PCL (aeglase vabanemisega) ja PCL/PEO (kiire vabanemisega) nanofiibermatte (Preem, Bock, et al., 2019; Preem et al., 2017). Taoliste mattidele pole sobivaid farmakopöa teste ning seetõttu uuriti meetodeid, mis suudaksid erinevate omadustega haavakatteid võrrelda ja neid eristada.

Kõigepealt uuriti PCL ja PCL/PEO nanofiibermatist raviaine klooramfenikooli vabanemise kiirust ja ulatust bioreporteriga. Eesmärk oli välja töötada bioreporter katsemudel, mille abil oleks võimalik erineva vabanemiskiirusega nanofiibermatte võrrelda.

Lisaks oli eesmärk välja töötada *in vitro* ja *ex vivo* infektsioonimudelid, milles oleks võimalik nanofiibermatte testida, et vähendada loomkatsete tegemise vajadust. Samuti sooviti loodud infektsioonimudeleid omavahel võrrelda. *In vitro* katsetes kasutati elektrosppinnitud želatiini ja *ex vivo* katsetes seakõrva nahka. Veel uuriti PCL ja PCL/PEO nanofiibermatte koos mudelraviaine klooramfenikooliga, et teada saada nende toimimine erinevate infektsioonitekitajate korral.

Töömahu vähendamise eesmärgil testiti Alamar Blue metaboolset indikaatorvärvi proovides bakterite arvukuse leidmiseks asendamaks tulevikus kolooniate lugemise meetodit.

### 2.2. Materjal ja metoodika

#### 2.2.1. Töös kasutatud bakterid

Bioreporter plasmidi kloonimiseks kasutati *Escherichia coli* tüve DH5 $\alpha$  ning plasmid viidi hiljem bakteri *Escherichia coli* tüvesse MG1655. Need mõlemad on tavalised laboritüved. DH5 $\alpha$  puhul on tüves tehtud mitmed modifikatsioonid, et suurendada transformatsiooniefektiivsust (DH5-Alpha *E. coli* - Microbewiki). MG1655 puhul on tehtud minimaalselt mutatsioone, tüves puudub F-plasmid ning  $\lambda$ -faag (Blattner et al., 1997; Jensen, 1993).

Infektsioonimudeli katsetes kasutati *Escherichia coli* tüve DSM 1103 (ka ATCC 25922). See kliiniline isolaat on standardtüvi antibakteriaalsete ainete testimisel. (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details*, (a); Matuschek *et al.*, 2014; Minogue *et al.*, 2014). *E. coli* tüve DSM 1103 kasutati ka biofilmi bakterite arvukuse määramiseks Alamar Blue indikaatori abil.

Infektsioonimudeli katses kasutati ka *Staphylococcus aureus*-e tüve DSM 2569 (ka ATCC 29213). See tüvi on kliiniline isolaat, mida kasutatakse kvaliteedikontrolliks laborites (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details*, (b); Matuschek *et al.*, 2014; Soni *et al.*, 2015)

Kolmanda bakterina kasutati infektsioonimudeli katses *Staphylococcus epidermidis*-e tüve DSM 28319 (ka ATCC 35984). Tüvi on isoleeritud kateetri sepsisest (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details*, (c)).

### **2.2.2. Töös kasutatud söötmed**

Kõiki tüvesid kasvatati firma BD<sup>TM</sup> Difco<sup>TM</sup> Lennox LB söötmel, mis valmistati vastavalt tootja juhendile ja steriiliti. Agarsööde autoklaaviti ning vedelsööde steriiliti 0,22 µm poori läbimõõduga filtriga või autoklaaviti. Valmis söödet säilitati 4 °C juures kuni nädal aega.

Bioreporter katse kasutati MOPS minimaalsöödet (1xMOPS; 0,4% glükoos; 1,32 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 9,5 mM NH<sub>4</sub>Cl) agariga (1,5%). Destilleeritud veega segatud agar autoklaaviti ning segati teiste steriilsete koostisosadega steriilsetes tingimustes (laminaari all).

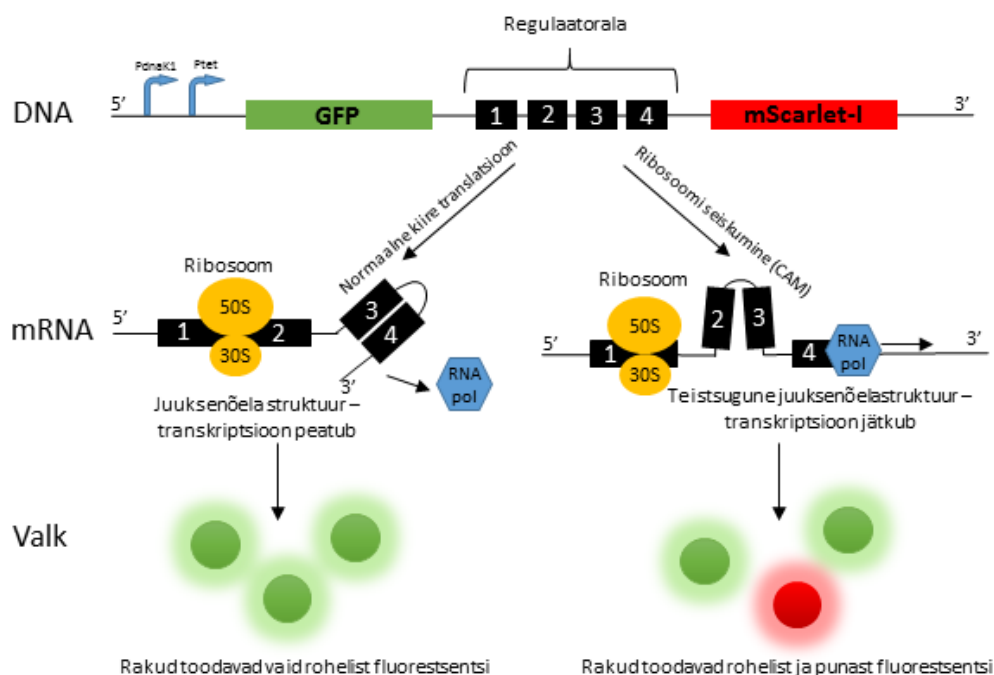
Infektsioonimudeli katsetes kasutati koekultuurisöödet DMEM/F-12 Ham (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (L-glutamiini ja fenoolpunaseta) koos 10% (V/V) FBS-iga (*Fetal Bovine Serum*) (edaspidi DMEM+FBS). Alamar Blue katses kasutati DMEM/F-12 Ham söödet (L-glutamiini ja fenoolpunaseta) (edaspidi DMEM). Enne kasutamist steriiliti infektsioonimudeli katse ja Alamar Blue katse vedelsöötmed filtreerimise teel (poori diameeter: 0,22 µm).

Kõik kasutatud söötmed ja kemikaalid on kokkuvõtvalt toodud tabelis lisades (Lisa 1).

### **2.2.3. Töös kasutatud plasmiid**

Bioreporter katse esialgne plasmiid konstrueeriti autori bakalaureusetöös (Sagor, 2018) ja seda täiustati artikli (Preem, Bock, *et al.*, 2019) jaoks. Käesolevas magistritöös kasutati artiklis avaldud plasmiidiga (pSC101-GFP-term-trpL-mScarlet-I) bakteritüve.

*E. coli* tüvesse MG1655 viidud plasmiidilt kodeeritakse konstitutiivselt rohelist fluorestseeruvat valku (GFP). Transkriptsioon peatub enne punast fluoresteeruvat valku (mScarlet-I) mRNA konformatsiooni tõttu regulaatoralas. Antibiootikumi klooramfenikool (CAM) juuresolekul hakkavad bakterid tootma ka mScarlet-I-d, kuna ribosoomi muutunud kineetika tõttu tekib alternatiivne mRNA konformatsioon ning transkriptsioon saab minna lõpuni. Reporteri töö põhimõte on toodud joonisel (Joonis 2). Plasmiidikaart on toodud lisades (Lisa 2).



**Joonis 2. Bioreporteri tööpõhimõte. CAM – antibiootikum klooramfenikool, GFP – roheline fluorestseeruv valk, mScarlet-I – punane fluorestseeruv valk. Kohandatud (Preem, Bock, *et al.*, 2019).**

#### 2.2.4. Töös kasutatud elektrosppinnitud nano- ja mikrofiibermatid

PCL ja PCL/PEO nanofiibermati valmistamiseks lahustati polümeer kloroformi ja metanooli segus ning jäeti üleöö magnetsegajale lahustuma. Mudelraviainet sisaldavate mattide korral lisati lahustumise alguses ka antibiootikum klooramfenikool (CAM). Täpsed polümeeri ja lahusti kogused on toodud tabelis (Tabel 2). PCL(/CAM) ning PCL/PEO(/CAM) nanofiibermatid spinniti kasutades automatiseeritud elektrosppinnimise süsteemi ESR200RD (NanoNC) (Preem, Bock, *et al.*, 2019). Täpsed elektrosppinnimise parameetrid on toodud tabelis (Tabel 3). Kõik nanofiibermatid steriiliti  $\gamma$ -kiirguse abil (~50 kGy) (Preem, Vaarmets, *et al.*, 2019). Elektrosppinnitud nanofiibermatt pakiti steriilsesse alumiiniumfooliumisse ja minigriip kotti. Nanofiibermatte säilitati toatemperatuuril eksikaatoris 0% niiskuse juures,

valguse eest kaitstult. Elektrosپinnitud nanofiibermatid valmistas Tartu Ülikooli Farmaatsia Instituudis Kairi Tiirik.

**Tabel 2.** Elektrosپinnitud nanofiibermattide lahused. Kohandatud (Preem, Bock, *et al.*, 2019).

Nanofiibermatt	Polümeer	Lahusti
<b>PCL(/CAM)</b>	PCL 12,5 % (w/V) (/CAM 4% w/V)	Kloroform ja metanool (3:1 V/V)
<b>PCL/PEO(/CAM)</b>	PCL 10% (w/V)/ PEO 2% (w/V) (/CAM 4% w/V)	Kloroform ja metanool (3:1 V/V)

**Tabel 3.** Töös kasutatud elektrosپinnitud materjalide valmistamise parameetrid. Kohandatud (Preem, Bock, *et al.*, 2019).

	PCL (+CAM)	PCL/PEO (+CAM)	Želatiinilahus
<b>Pinge</b>	9 kV	12 kV	18-19 kV
<b>Voolukiirus</b>	1 ml/h	2,5 ml/h	15 µL/min
<b>Kaugus nõela tipust kollektorini</b>	14 cm	17 cm	15 cm
<b>Kollektori pöörlemiskiirus</b>	25 mm/min	25 mm/min	20 mm/min
<b>Spinnitava vedeliku kogus</b>	10 ml	10 ml	3 ml

### 2.2.5. Töös kasutatud želatiin ja seanahk

Želatiini fiibermati valmistamiseks lahustati želatiini (90%) ja glükoosi (10%) pulbrisegu 10 M äädikhappes 24 h jooksul toatemperatuuril magnetsegajaga. Želatiini lõppkontsentratsioon lahuses oli 25%.

Želatiini nanofiibermattide valmistamiseks kasutati automatiseeritud elektrosپinnimise süsteemi ESR200RD, (NanoNC). Tabelis 3 on toodud elektrosپinnimise parameetrid. Spinnimine teostati toatemperatuuril (25 °C) ja suhtelise niiskuse 20% juures. Fiibermatt koguti alumiiniumfooliumiga kaetud pöörlevale kollektorile.

Seejärel ristseondati (*crosslinking*) želatiini fiibermatt termilisel töötlemisel 170 °C juures 3 tunni jooksul, et parandada fiibermati füüsikalisi omadusi. Steriiliti γ-kiirguse abil (~50 kGy) (Preem, Vaarmets, *et al.*, 2019).

Töös kasutatud seakõrv toodi värskest tapamajast ning lõigati 10x10 cm tükkideks, vajadusel raseeriti, et karvad ei takistaks nanofiibri asetamist seanahale. Seejärel asetati proovid 20%-lise glütserooliga täidetud anumasse kaheks tunniks, et hoida ära jääkristallide teke külmutamisel. Seejärel võeti nahatükid glütseroolist ning pakendati minigriip kottidesse, külmutati vedelas lämmastikus ja asetati kuivale jääle, milles saadeti ka steriilimisse  $\gamma$ -kiirguse abil (~50 kGy). Selline kiirgusvoog valiti, sest varasemalt on näidatud, et see toimib nanofiibermattide puhul (Preem, Vaarmets, *et al.*, 2019).

Päev enne katset lõigati 1x1 cm suurused tükid steriilitud proovist laminaari all ning asetati need 50 ml-sesse tuubi 1X PBS-i (fosfaatpuhverdatud soolalahus – *phosphate-buffered saline*) lahusesse 4 °C juurde. Päeva jooksul vahetati 1X PBS-i, et vabaneda sulanud tükkide küljest eraldunud jääkidest. Vahetult enne kasutamist puhastati naha pind steriilse vatitikuga 70%-lise etanooliga õrnalt hõõrudes. Töös kasutatud želatiin ja seanahk valmistati ette Tartu Ülikooli Farmaatsia Instituudis Kairi Tiiriku poolt.

#### **2.2.6. Nanofiibermattide testimine bioreporteriga**

Bioreporterit tüvi MG1655+pSC101-GFP-term-trpL-mScarlet-I külvati glütserooli säilituskultuurist üksikkolooniateks steriilse külviaasaga antibiootikumi (ampitsilliin (AMP) 100 µg/ml) sisaldavale LB agarsöötmele. Üksikkolooniast alustati üleöö kultuur AMP-i sisaldavas (100 µg/ml) LB vedelsöötmes ning järgneval päeval lahjendati OD<sub>600</sub> juures 0,05-ni värskesse AMP-i sisaldavasse LB vedelsöötmesse ning kasvatati kuni OD<sub>600</sub> oli ligikaudu 0,5 (eksponentsiaalne kasvufaas). Kultuur jahutati jääl kasvu peatamiseks ning tehti 8%-lised DMSO (dimetüülsulfoksiid) säilituskultuurid, mis vedela lämmastikuga külmutamise järel asetati -80 °C kappi.

Reporterit DMSO säilituskultuurist tehti 20X lahjendus PBS-i ning plaaditi PBS-is niisutatud vatitikuga eelkuivatatud MOPS minimaalsöötmega tassile, kuna sellest söötimest tulenev autofluorestsents on minimaalne ning ei sega signaali lugemist. Plaaditud tass jäeti 10 tunniks 37 °C juurde kasvama. Seejärel lisati PCL/CAM ja PCL/PEO/CAM nanofiibermatid tassile. Pärast nanofiibermattide lisamist pildistati tasse koheselt Amersham Typhoon skänneriga (GE Healthcare Europe GmbH) (piksli suurus 100 µm; roheline fluorestsents: 488 nm laser, 525BP20 filter, PMT ping 352V; punane fluorestsents: 532 nm laser, 570BP20 filter, PMT ping 621V). Seejärel pildistati tasse iga tunni järel kuue tunni jooksul. Skännimine võttis aega umbes 6 minutit. Ajapunktide vahel hoiti tasse 37 °C juures.



### **2.2.7. Nanofiibermattide testimine *in vitro* ja *ex vivo* infektsioonimudelitega**

Infektsioonimudeli katse jaoks steriiliti filterpaber ultraviolettkiirgusega 30 min mõlemalt poolt, lambi kaugus 15 cm. Steriilsetes tingimustes laminaari all lõigati  $\gamma$ -kiiritatud želatiinmatid, PCL ja PCL/PEO nanofiibermatid ning lõigati antibiootikumi sisaldavad nanofiibermatid. Seakõrva naha tükkidel 50 ml-ses tuubis vahetati PBS värske vastu. *E. coli*, *S. aureus*-e ja *S. epidermidis*-e bakteritüved kasvatati ette 3 ml-s LB vedelsöötmes 20 h 37 °C juures Sanyo OrbiSafe loksutil 220 rpm. Kultuuri lahjendati 100X 1X PBS-iga.

Steriilsetes tingimustes pandi 24-kannulise mikrotiiterplaadi kannudesse pintsettidega 3 steriilset filterpaberit, et hoida niiskust kannus, ning pipetiti 250  $\mu$ l DMEM+FBS söödet. Seejärel asetati filterpaberite peale haava imiteerimiseks želatiini või seakõrva naha tükk (edaspidi substraat) ning lisati 10  $\mu$ l eelkasvatatud ja lahjendatud (100X) kultuuri (*E. coli*, *S. aureus* või *S. epidermidis*). Ühel plaadil kasutati vaid ühte substraati ja ühte bakterit. Substraadile lisati PCL või PCL/PEO nanofiibermatt. Mudelraviainena sisaldas matt antibiootikumi klooramfenikool (edaspidi PCL/CAM või PEO/CAM). Antibiootikumi mittesisaldavat samadel tingimustel valmistatud nanofiibermatti (edaspidi PCL või PEO) kasutati, et uurida nanofiibermati koostisest tulenevaid toimeid. Negatiivseks kontrolliks jäeti osa substraati nanofiibriga katmata. Proove oli kõiki kolmes tehnilises korduses. Seanaha proovidele lisati ka 96%-lises etanoolis steriilitud, just 24-kannulise mikrotiiterplaadi kannu jaoks disainitud, plastikust insert (Scaffdex), mis suruks nanofiibermati tihkelt vastu seanahka. Eraldi kontrollid jäeti filtrile, inserdile, seanahale ja želatiinile, PCL ja PEO proovidele ning steriilsuse testimiseks plaaditi eelkuivatatud LB agarsöötmele ka söödet DMEM+FBS. Proove inkubeeriti 37 °C juures 24 või 48 tundi.

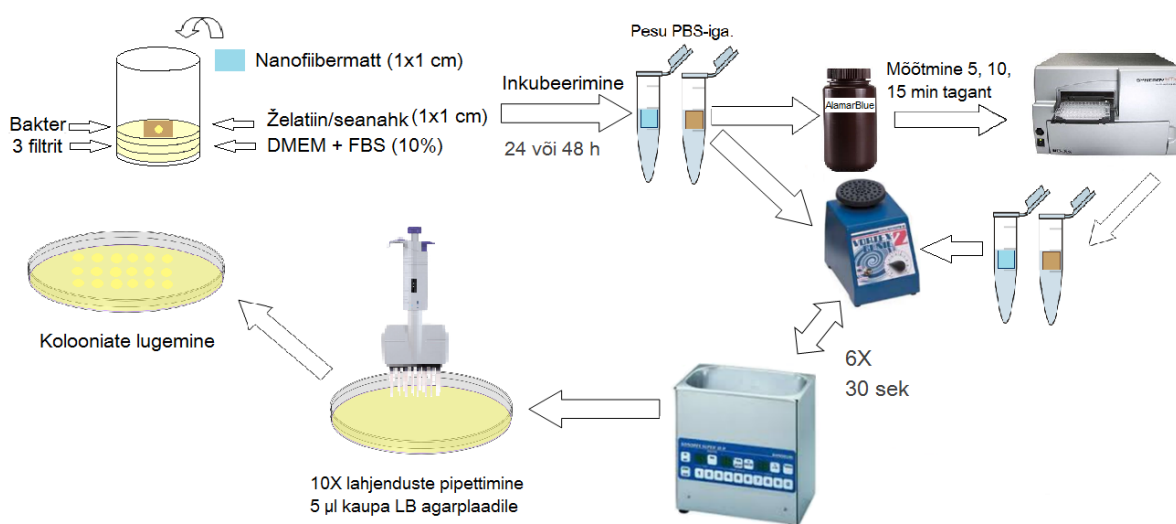
### **2.2.8. Nanofiibermattidele ja substraadile kinnitunud bakterite arvukuse määramine CFU meetodil**

Ajapunkti saabudes eraldati pintsettidega polümeeri nanofiibermatt ning substraat ja asetati jaheda 1X PBS-iga täidetud (1 ml) tuubidesse. Seejärel segati hetkeks vorteksil (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, kõige kõrgem tugevus), et raputada lahti biofilmi küljes kergelt kinnitunud bakterid. Pärast segamist tõsteti pintsettidega nanofiibermatt ning substraat uutesse jaheda 1X PBS-iga täidetud (1 ml) tuubidesse. Sama tehti ka kontrollidega.

Tuube hoiti karbiga jääl kuniks kõik proovid olid eraldatud ja pestud. Seejärel väristati tuube 30 s vorteksil (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, kõige kõrgem tugevus) ning 30 s sonikeeriti (Bandelin Sonorex digital 10 P, töötades 20%-l maksimaalsest võimsusest), et

raputada materjalide küljest lahti tekkinud biofilm ja vabaneda agregaatidest. Vorteksimist ja sonikeerimist teostati 6 korda vaheldumisi. Seejärel võeti igast tuubist 100 µl proovi ning mikrotiiterplaadil tehti 10-kordsete lahjenduste rida 1X PBS-iga. Eelkuivatatud LB tassidele plaaditi lahjenduste rida 5 µl täppidena kahes korduses. Katse skeem on toodud alloleval joonisel (Joonis 3). Tasse inkubeeriti üleöö 37 °C juures ning järgneval päeval loeti kolooniad lahjenduses, kus oli kolooniate arv umbes 3-40. Seejärel arvutati kolme korduse kahe paralleeli põhjal bakterite kolooniat moodustavad ühikud (CFU – *colony vorming unit*) 1 cm<sup>2</sup> kohta.

Alamar Blue katses kasutati *E. coli* bakteritüve DSM 1103 ning substraadiks želatiini. Katses kasutati mudelraviainet mittesisaldavaid nanofiibermatte PCL ja PCL/PEO. Proove inkubeeriti 6 või 24 tundi.



**Joonis 3. Infektsioonimudeli katse skeem. DMEM - Dulbecco poolt modifitseeritud Eagle'i sööde; FBS – veise loote seerum.**

### 2.2.9. Nanofiibermattidele ja želatiinile kinnitunud bakterite arvukuse määramine Alamar Blue indikaatori abil

Alamar Blue (Bio-Rad) on rakkude elumuse hindamiseks kasutatav indikaator, mille toimeaine resasuriin on sinine ja mittefluorestseeruv värv. Elus rakud redutseerivad indikaatori tugevalt fluorestseeruvaks ning värvuselt roosaks resorufiiniks. Alamar Blue mittetoksilisuse tõttu on seda hea kasutada rakkude arvukuse hindamiseks. (O'Brien *et al.*, 2000)

Alamar Blue katse tulemuste hindamiseks tehti kalibratsioonikõver. Üleöö kultuuri lahjendati 100X autoklaavitud LB vedelsöötmesse. Baktereid kasvatati kuni OD<sub>600</sub> oli 0,4-0,6 ning

kontsentreeriti ( $OD_{600}=1$ ). Tehti lahjendused 1X PBS-i 24-kannulisse mikrotiiterplaati ning lisati Alamar Blue värv (10% ruumalast). Plaat asetati 37 °C juurde inkubeerima. 5, 10 ja 15 minuti möödudes pipetiti 96-kohalisse mikrotiiterplaati 100 µl proovi ning mõõdeti koheselt pärast pipettimist mikrotiiterplaadilugejaga BioTek SynergyMX fluorestsentsi ergastusega 545 nm ( $\pm 20$  nm) ning emissiooni 590 nm ( $\pm 20$  nm), tundlikkusega 50 (inglise keeles: *gain*).

Infektsioonikatse ajapunkti saabudes eraldati želatiin ja nanofiiber ning asetati need 1 ml sooja 1X PBS-iga täidetud tuubidesse. Väristati hetkeks vorteksil, et vabaneda biofilmi küljes olevatest kergelt kinnitunud bakteritest ja agregaatidest ning asetati proov uude 24-kannulisse mikrotiiterplaati 450 µl sooja PBS-i. Sama tehti ka kontrollidega. Seejärel lisati igale proovile 50 µl Alamar Blue indikaatorit ning asetati 37 °C juurde. 5, 10 ja 15 minuti möödudes tõsteti 100 µl vedelikku 96-kannulisse mikrotiiterplaati ning mõõdeti koheselt BioTek SynergyMX mikrotiiterplaadilugejaga fluorestsentsi ergastusega 545 nm ( $\pm 20$  nm) ning emissiooni 590 nm ( $\pm 20$  nm) pikkusel lainepikkusel, tundlikkusega 50 (inglise keeles: *gain*).

Selleks et võrrelda Almar Blue katsega saadud hinnangut bakterite arvukusele tehti samade proovidega ka CFU määramine, milleks tõsteti proovid uutesse jahedatesse 1 ml 1X PBS-i sisaldavatesse tuubidesse. Väristati 30 s vorteksil (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, kõige kõrgem tugevus) ning sonikeeriti 30 s (Bandelin Sonorex digital 10 P, töötades 20%-l maksimaalsest võimsusest), et raputada lahti tekkinud biofilm. Neid protsesse korraldati 6 korda. Seejärel tehti 96-kannulisse mikrotiiterplaati 10X lahjendused 1X PBS-i ning plaaditi kahes korduses 5 µl kaupa eelkuivatatud LB agarsöötmele. Katse skeem on toodud eelneval joonisel (Joonis 3). Tasse inkubeeriti üleöö 37 °C juures ning järgmisel päeval loeti kolooniad lahjendustes, kus kolooniaid oli umbes 3-40. Seejärel arvutati kolme korduse kahe paralleeli põhjal bakterite CFU 1 cm<sup>2</sup> kohta.

Varasemalt teostatud katsete põhjal meie laboris on näidatud, et kui  $OD_{600}=1$  siis CFU/ml on  $\sim 1 \times 10^9$ . See võeti ka käesolevas töös eelduseks. Kõigepealt leiti kalibratsioonisirge võrrand kuue erineva CFU ja kolme ajapunkti (5, 10 ja 15 min) põhjal (Lisa 4). Sarnaselt leiti sirge võrrandid katsetulemuste jaoks. (Lisa 4). Katsetulemuste võrrandite tõusud asendati kalibratsioonisirge võrrandisse. Niiviisi leiti bakterite CFU/cm<sup>2</sup> kohta kolme tehnilise korduse põhjal ning seetõttu pole Alamar Blue katse tulemustel näha standardhälbeid (Joonis 9A).

## 2.2.9. Andmete analüüs

### 2.2.9.1. Nanofiibermattide testimine bioreporteriga

Skaneeritud tasse analüüsiti ImageJ (versioon: 1.52t 30) programmiga. Inhibitsiooniringi raadiuse leidmiseks leiti kõigepealt rohelise fluorestsentsi kanalist inhibitsiooniringi pindala, kasutades kohendatud automaatseid tööriistu. Edasi töödeldi andmeid programmiga MS Excel (Professional Plus 2010).

### 2.2.9.2. Nanofiibermattide testimine *in vitro* ja *ex vivo* mudelitega

Andmete analüüs viidi läbi kasutades MS Excel (Professional Plus 2010). Katse tulemustele leiti aritmeetilised keskmised ja standardhälbed. Statistiliseks analüüsiks kasutati t-testi. Statistiliselt oluliseks erinevuseks loeti p-väärtus alla 0,05. Andmetena kasutati substraadi ja nanofiibermati liidetud tulemusi ning kasutati kolme tehnilist kordust igast proovist.

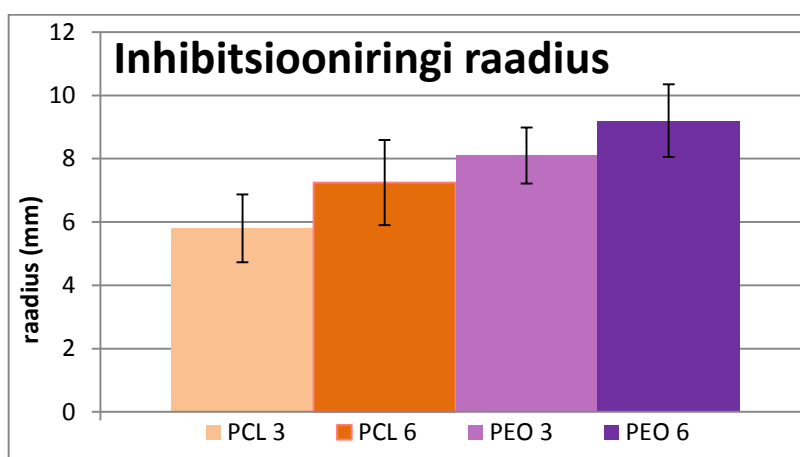
### 2.2.9.2. Bakterite arvukuse määramine Alamar Blue indikaatori abil

Tulemusi analüüsiti kasutades programmi MS Excel (Professional Plus 2010).

## 2.3. Tulemused

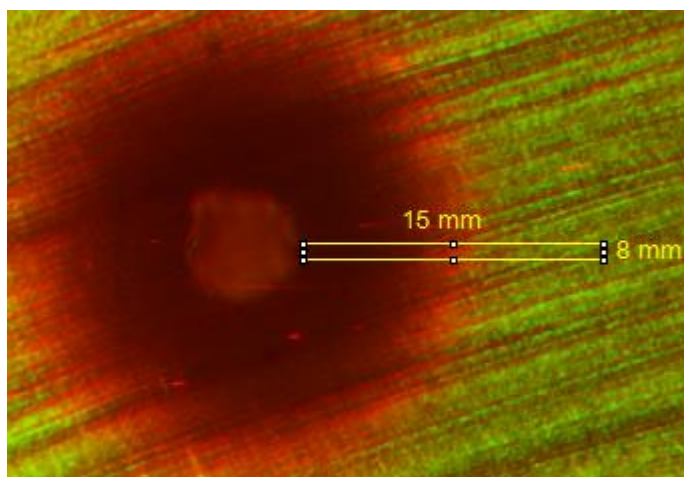
### 2.3.1. Nanofiibermattide testimine bioreporteriga

Bioreporter katse inhibitsiooniraadiused on toodud välja joonisel 4 ning need leiti kahes ajapunktis - 3 tunni pärast nanofiibermattide tassile panekust ning 6 tunni pärast (Joonis 4). Graafikul on esitatud kolme katse aritmeetiline keskmine ja standardhälve.



**Joonis 4. Bioreporter katse inhibitsiooniringide raadiused (mm). PCL – PCL/CAM nanofiibermatt; PEO – PEO/CAM nanofiibermatt; 3 – 3 tundi pärast nanofiibermattide lisamist plaadile mõõdetud inhibitsiooniring; 6 – 6 tundi pärast nanofiibermattide lisamist plaadile mõõdetud inhibitsiooniring; raadius (mm) – inhibitsiooniringi raadius millimeetrites.**

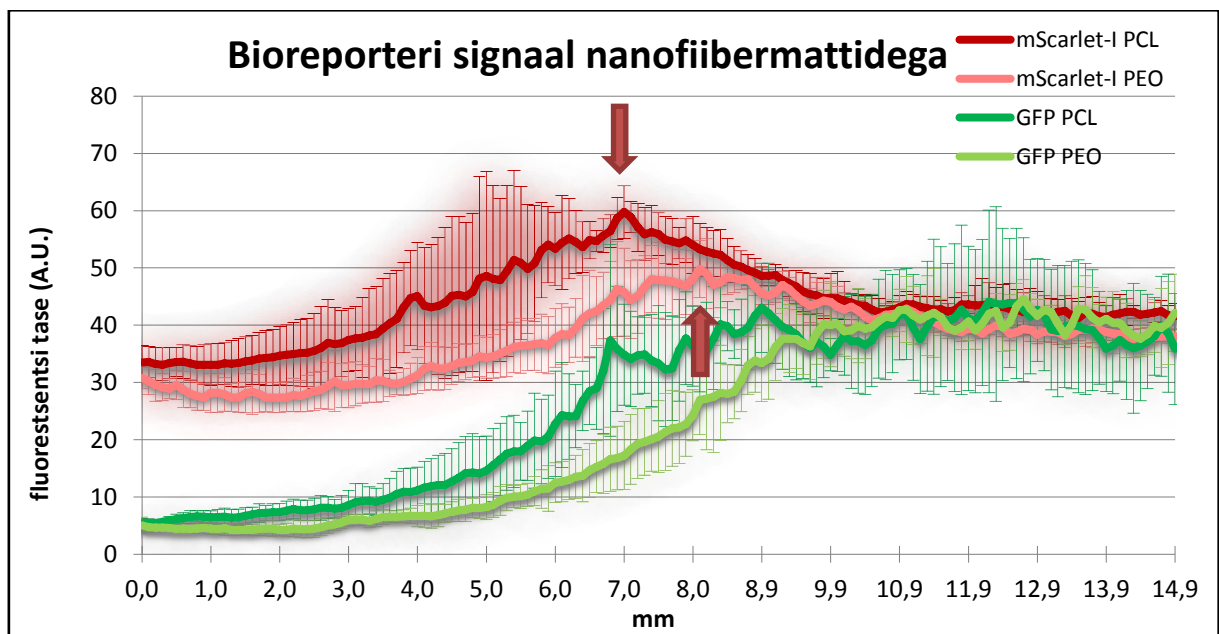
Graafikult (Joonis 4) on näha, et PCL/CAM matiga proovil, mis vabastab oma hüdrofoobsuse tõttu raviainet aeglasemalt, on raadius väiksem kui PEO/CAM matiga proovil (hüdrofiilsuse tõttu kiiremini raviainet vabastav matt) ning seda mõlemas mõõdetud ajapunktis. Veelgi enam, PEO/CAM matiga proovi inhibitsiooniraadius on 3 tunni möödumisel suurem kui PCL/CAM matiga proovi inhibitsiooniraadius 6 tunni möödumisel. 3 tunni möödumisel on PCL/CAM nanofiibermati inhibitsiooniraadius 5,8 mm ning PEO/CAM raadius 8,1 mm. Vastavad raadiused 6 tunni möödumisel on 7,2 mm ning 9,2 mm.



**Joonis 5. Fluorestsentsi intensiivsuse leidmine tassilt ImageJ abil. Pildil on toodud punane ja roheline fluorestsents ülekattes. Analüüsitud piirkond on näidatud kollase kastiga, mille pikkus on 15 mm ning laius 8 mm. Inhibitsiooniringi (tume ala) keskel on PEO/CAM nanofiibermatt.**

Samadelt tassidelt mõõdeti ka reportervalgu punase fluorestsentsi intensiivsust hallväärtuste abil kuuendal tunnil pärast nanofiibermattide lisamist tassile. Tulemused on toodud joonisel (Joonis 6). Ka nende väärtuste korral leiti kolme katse aritmeetiline keskmine ning standardhälve. ImageJ programmis valiti 1,5 cm pikkune ning 0,8 cm laiune ala nanofiibermati servast üle inhibitsiooniringi bakterite kasvualale (Joonis 5). Roheline fluorestsents leiti pildikanalist, kus oli nähtav vaid roheline valk ning punane fluorestsents vastavalt punase valgu ergastusega kanalist (Lisa 3).

Joonistelt (Joonised 5 ja 6) on selgelt näha bakterite kasvu inhibeerimine klooramfenikooli poolt – tume ala joonisel 5, madalam graafiku osa (vasakul) joonisel 6. Punane sõõr tumeda ala ümber (Joonis 5) näitab antibiootikumi olemasolu MIC-ist madalamatel kontsentratsioonidel – reporterrakud on alustanud punase valgu tootmist ribosoomi peatumise tõttu regulaatoralas. Edasine roheline osa ei sisalda klooramfenikooli taset, mis takistaks normaalset translatsiooni ehk bakterid toodavad vaid rohelist kontrollvalku.



**Joonis 6.** Kuuendal tunnil mõõdetud fluorestsentsi intensiivsuse muutus standardhälvetega. PCL – PCL/CAM nanofiibermatt; PEO – PEO/CAM nanofiibermatt; mScarlet-I – punane fluorestseeruv valg; GFP – roheline fluorestseeruv valg; mm – kaugus nanofiibermatist millimeetrites; punane nool – mScarlet-I piik.

Joonisel 6 on näha mScarlet-I ehk punase fluorestseeruva valguga taseme piik, mis vastab kõige kõrgemale reporteriga mõõdetavale CAM kontsentratsioonile. Joonisel 6, PCL/CAM nanofiibri korral on mScarlet-I märgitud tumepunase joonega ja PEO/CAM nanofiibri korral on mScarlet-I märgitud roosa joonega. Esimese puhul on piik ~7 mm kaugusel nanofiibrist ning teise puhul ~8 mm kaugusel nanofiibrist. See näitab taas, et PEO/CAM nanofiiber vabastab raviainet kiiremini ning kaugemale, kuid kahe mati erinevus on väiksem, kui varasemates katsetes (Preem *et al.*, 2017). Veel on neil joonistel näha GFP ehk rohelise fluorestseeruva valguga taseme tõus ning mScarlet-I-ga ühtlustumine pärast mScarlet-I piiki. Kuna CAM takistab valgusünteesi, on CAM-i kontsentratsiooni suurenemisel GFP tootmine vähenenud, seetõttu on GFP tase fiibrile lähemal madalam. Teatud kaugusel fiibrist muutub CAM-i kontsentratsioon liiga madalaks, et valgutootmist mõjutada ja GFP tase on maksimaalne. mScarlet-I tase on maksimaalne CAM subinhibitoorse kontsentratsiooni juures, kus valgusüntees on veel mingil määral võimalik, kuid ribosoom on tugevalt inhibeeritud. Kaugemal fiibrist, kus CAM translatsiooni enam ei mõjuta, saavutatakse mScarlet-I produktsioonis baastase ning fluorestsents ühtlustub. Teatud kõikumisi fluorestsentsi tasemes tekitavad tehnilised iseärasused nagu plaatimise ühtlusest tulenev erinevus bakterite hulgas, tolmuühemetest tulenev müra jms. Autofluorestsents kummaski kanalis on minimaalsöötme puhul madal.

Joonistelt 4 ja 6 on näha, et PEO/CAM vabastab raviainet kiiremini ning kaugemale. Inhibitsiooniraadiuse vahe PCL/CAM ja PEO/CAM vahel kolmandal ja kuuendal tunnil pärast nanofiibermattide lisamist on vastavalt 1,4 ja 1,1 mm.

### **2.3.2. Nanofiibermattide testimine *in vitro* ja *ex vivo* infektsioonimudelitega**

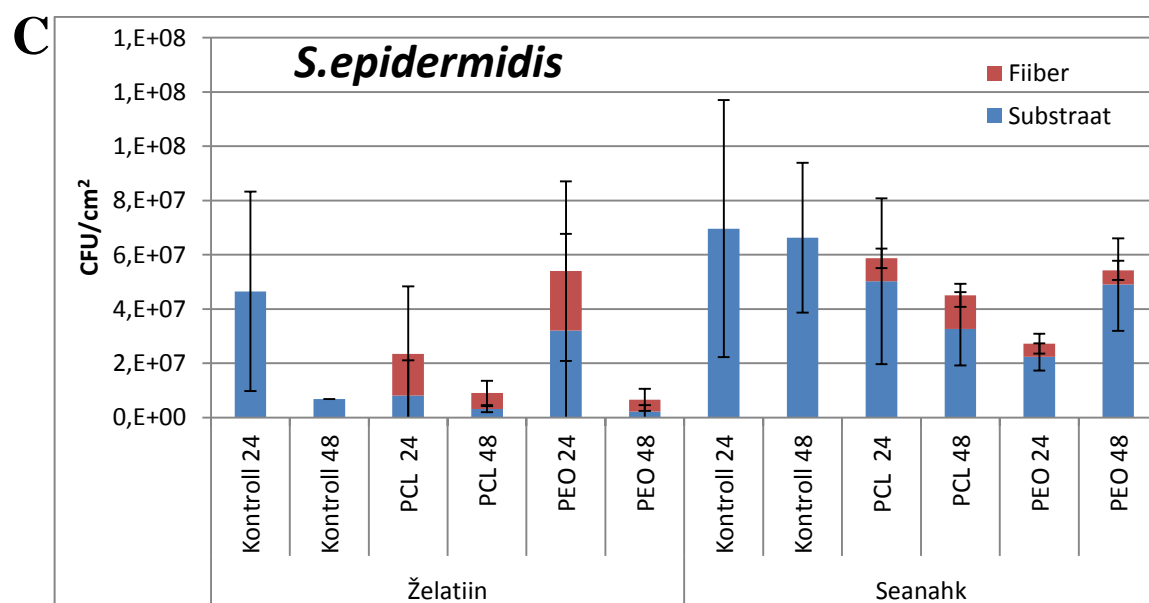
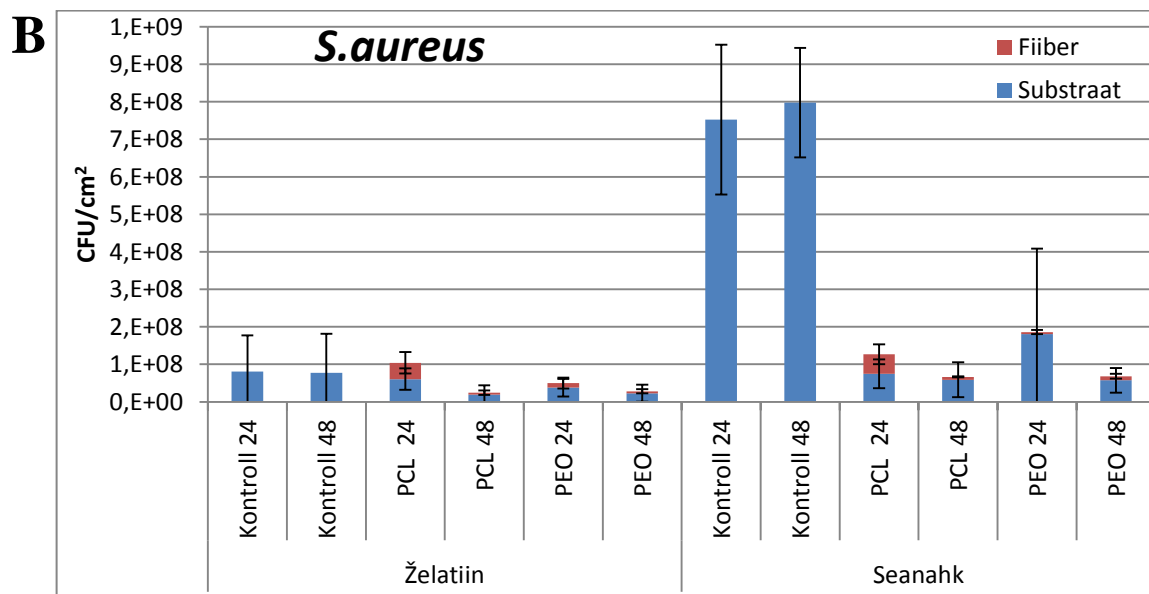
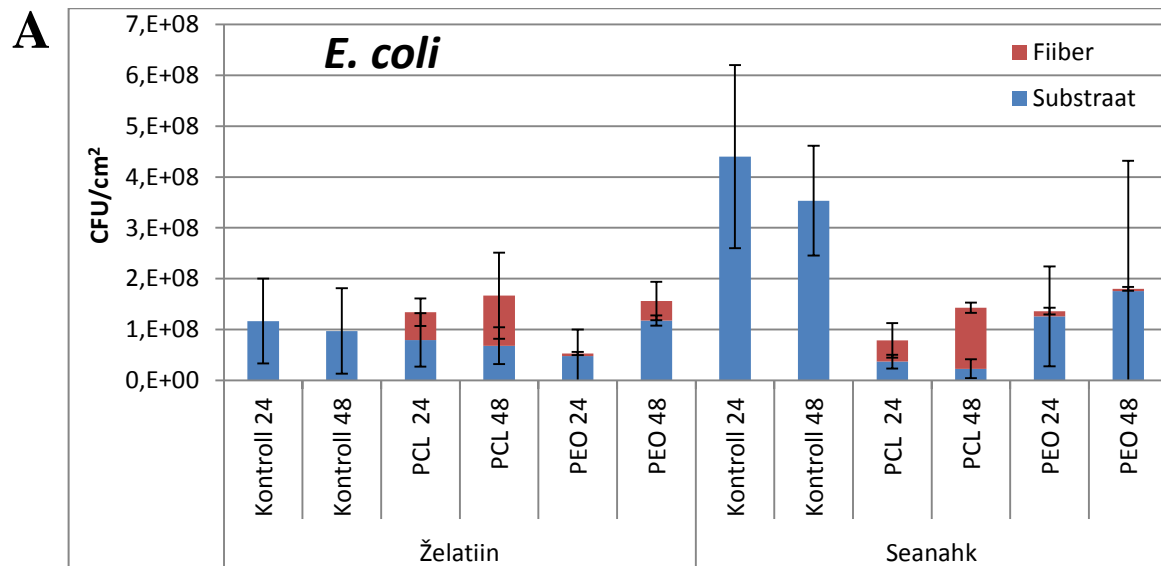
CFU/cm<sup>2</sup> arvutustulemused on nähtavad järgnevatel joonistel (Joonis 7 ja 8). Meenutuseks lugejale, et substraat eraldati nanofiibermaist ning bakterite arvukust hinnati eraldi.

Joonisel 7 on toodud bakterite arvukused antibiootikumita proovis (Joonis 7). Nende katsetega sooviti välja selgitada, kuidas mõjutab nanofiibermaist abiainete koostis bakterite kasvu infektsioonimudelites.

Üldiselt on näha, et kõige kõrgemad arvukused on *S. aureus*-e puhul ning kõige madalamad *S. epidermidis*-e puhul. Kõikide bakterite puhul on näha, et kõige kõrgemad arvukused on seanaha nanofiibermaistita proovis (kontroll). Želatiini kontrolli (nanofiibermaistita) bakterite arvukus ei erine statistiliselt oluliselt nanofiibermaistiga proovist ja seda kõikide bakterite korral (statistiliselt ei õnnestunud näidata, et need on erinevad) (Joonis 7).

Graafikutelt on näha, et bakterite arvukus on suurem substraadi küljes kui nanofiibermaist küljes, kuid enamasti on kontrollides arvukused suuremad kui nanofiibermaistiga proovides (Joonis 7). Seega saab öelda, et mudelraviainet mittesisaldavate nanofiibermattide lisamine pärsib bakterite kasvu.

Kasutatud mudeli korral võib öelda, et bakterite arvukus ajas langeb. Seda oli näha enamike *S. epidermidis*-e ja kõikide *S. aureus*-e proovide korral, kuid *E. coli* puhul seda üldistust teha ei saa.

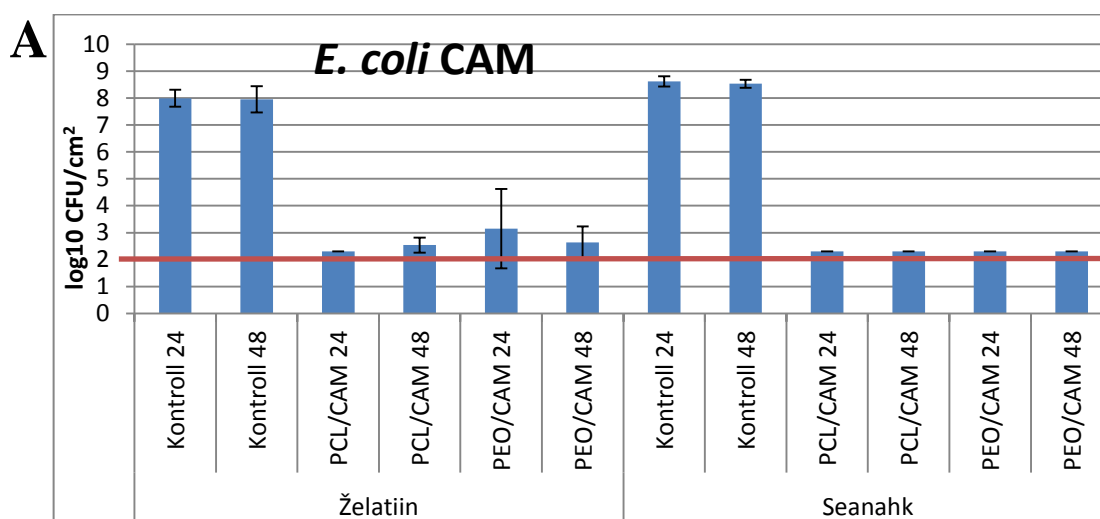


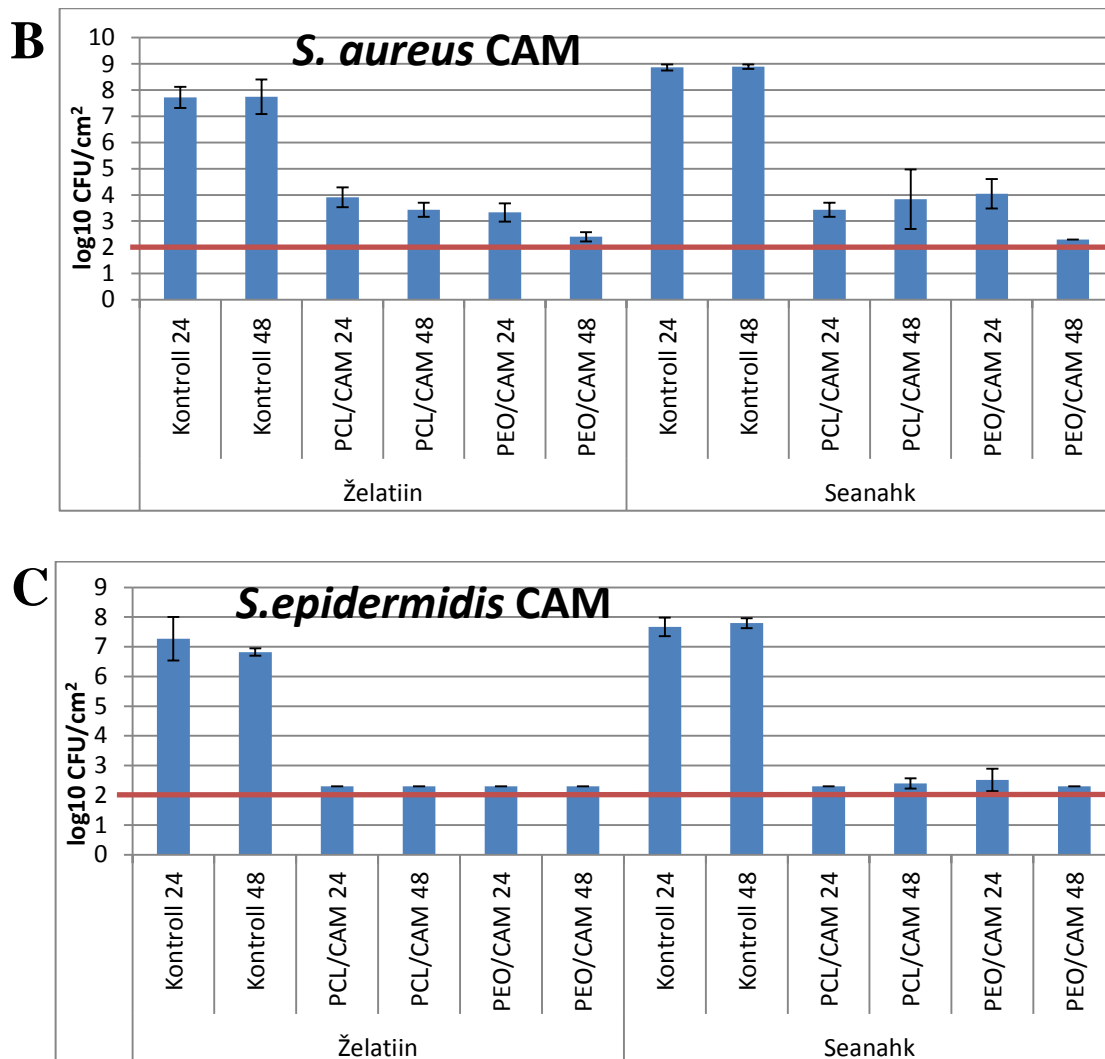


**Joonis 7. (A) *Escherichia coli*, (B) *Staphylococcus aureus*-e ja (C) *Staphylococcus epidermidis*-e arvukused antibiootikumita proovides uurimaks nanofiibermattide mõju bakterite arvukusele. Fiiber – nanofiibermatt; substraat – želatiin või seanahk; kontroll – nanofiibermatita proov; PCL – PCL nanofiibermatt, PEO – PEO nanofiibermatt; 24 – 24 tunni ajapunkt; 48 – 48 tunni ajapunkt. Märgitud on nii substraadi kui fiibri standardhälbed.**

Joonisel 8 on toodud bakterite arvukused logaritmilisel skaalal klooramfenikooli juuresolekul (Joonis 8). On näha, et kõige suurem arvukus esines seanaha kontrollis kõigi bakterite korral. Želatiini kontroll-proovides oli arvukus madalam kui seanaha kontrollides. Arvukused kontroll-proovides on sarnased erinevate bakterite korral.

Klooramfenikooli toime on selgelt nähtav, raviainet sisaldavates proovides on bakterite arvukus madalam kui raviaineta proovides, see leidis tõestust ka statistiliselt. *E. coli* ja *S. epidermidis*-e puhul on toime paremini nähtav, enamus proove jäid detektsioonipiirile. *S. aureus*-e puhul on enamike raviainet sisaldava proovide bakteriaalne arvukus kõrgem kui detektsioonipiir. *E. coli* puhul ei olnud detekteeritavat kasvu seanaha proovides klooramfenikooliga, želatiini proovides oli kõige rohkem kasvu PEO/CAM nanofiibri korral ning 24 tunni ajapunktis. *S. epidermidis*-e puhul on raviainega proovidest kasvu märgata vaid seanaha PEO/CAM proovis 48-ndal tunnil. *S. aureus*-e korral on kõige rohkem kasvu raviainega proovides võrreldes teiste bakteritega.





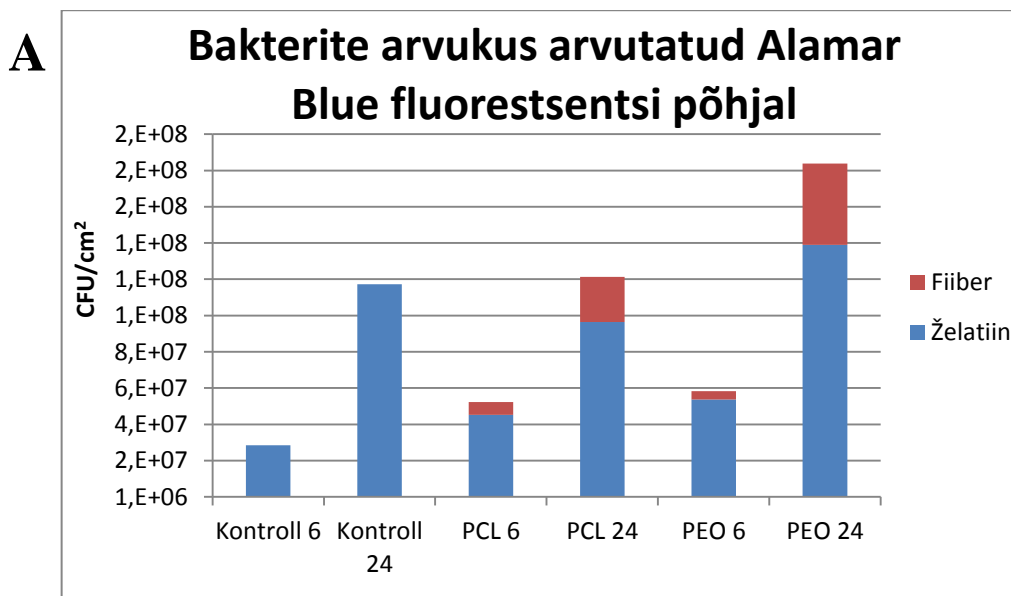
**Joonis 8. (A) *Escherichia coli*, (B) *Staphylococcus aureus*-e ja (C) *S. epidermidis*-e arvukused logaritmilises skaalas klooramfenikooliga proovis. Kontroll – nanofiibermatita proov; PCL – PCL/CAM nanofiibermatt, PEO – PEO/CAM nanofiibermatt; CAM - klooramfenikool; 24 – 24 tunni ajapunkt; 48 – 48 tunni ajapunkt, punane joon - detektsioonipiir. Lisatud on standardhälbed.**

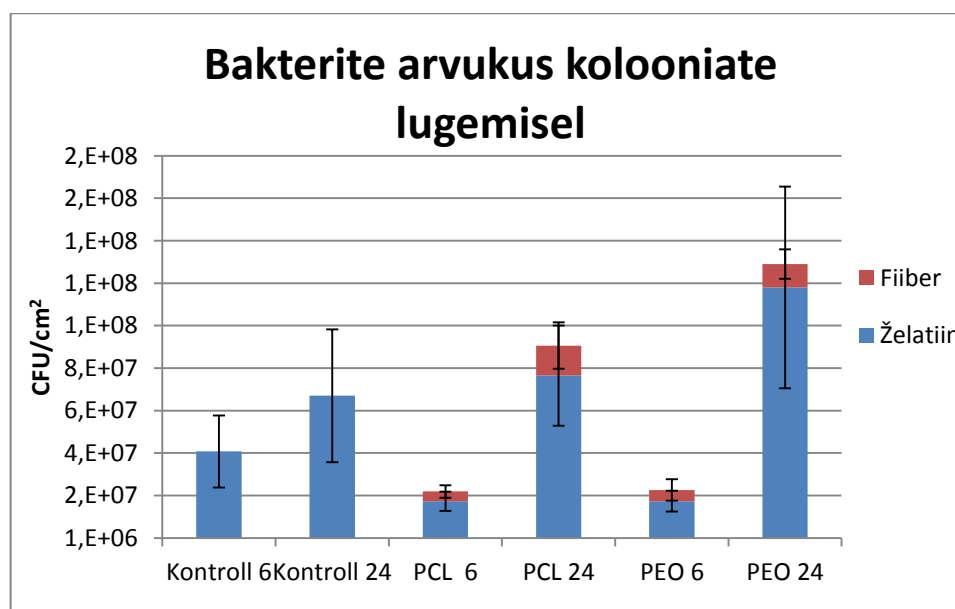
Vaadates graafikuid joonistel 7 ja 8 ei saa välja tuua kindlat erinevust PCL/CAM ja PEO/CAM nanofiibermati vahel (t-testi abil ei õnnestunud näidata, et need on statistiliselt erinevad), samuti ei ole märgatavat vahet kahe substraadi vahel (t-testi abil ei õnnestunud näidata, et need on erinevad). Nagu eeldatud, on näha, et klooramfenikooliga nanofiibermatid inhibeerivad mikroobide kasvu rohkem kui nanofiibermatt raviaineta, mudelis oli näha 5-6 kümnendlogaritmiline langus. Samuti on näha, et nanofiibermattidel on soovitud toime nii grampositiivsete (*S. aureus*, *S. epidermidis*) kui gramnegatiivsete (*E. coli*) bakterite vastu.

Biofilmi CFU määramiseks peab baktereid sonikeerima ja intensiivselt väristama vorteksil, selle käigus võivad mõned rakud ära surra ja kõik ei pruugi materjali küljest lahti tulla ehk

tulemuseks oleks madalam CFU kui reaalsuses on. Samuti ei pruugi kõik elus bakterid tassil üles kasvada. Seetõttu oleks hea leida mõni teine viis bakterite arvukuse määramiseks. Alamar Blue indikaatori abil on võimalik määrata kinnitunud biofilmis metaboolselt aktiivsete bakterirakkude hulka ilma CFU määramiseta. Ühtlasi vähendaks see töökoormust ja annaks võib-olla parema hinnangu biofilmi elusrakkude kohta. Näiteks torkab eelnevast katsest silma, et *S. epidermidis*-e maksimaalne CFU on ligi 10X väiksem võrreldes teiste bakteritega. Kerkivad küsimused, kas *S. epidermidis* kasvab aeglasemalt ja moodustab seetõttu vähem biofilmi või on tegemist tehnilise probleemiga CFU määramisel, näiteks ei tule biofilm lahti või bakterirakud surevad raputamise käigus ära.

Alamar Blue katse skeem on toodud joonisel 3 (Joonis 3). Tulemused on nähtavad joonisel 9A (Joonis 9). Joonisel 9B on näha saadud bakterite CFU/cm<sup>2</sup> kohta loendades LB agarplaadilt kolooniaid.



**B**

**Joonis 9. *Escherichia coli* arvukused (A) Alamar Blue värviga hinnates ning (B) tassilt kolooniaid lugedes, lisatud standardhälbed. Fiiber – nanofiibermatt; kontroll – nanofiibermatita proov; PCL – PCL nanofiibermatt, PEO – PEO nanofiibermatt; 6 – 6 tunni ajapunkt; 24 – 24 tunni ajapunkt.**

Joonise 9 kaks tulpdiagrammi on üsna sarnased, mis näitab, et kahe erineva meetodiga saadud tulemused on võrreldavad. Bakteri arvukused olid kõikides proovides 24 tunni ajapunktis kõrgemad kui sama proovi 6 tunni ajapunktis, mis on ka oodatud tulemus. Nanofiibermatiga proovis kasvas baktereid rohkem želatiini küljes kui mati küljes. Suures plaanis on arvukused Alamar Blue värviga saadult pisut suuremad, see võib viidata sellele, et raputamisega surevad mõned rakud ning kõik bakterid ei tule lahti materjali küljest.

Üldiselt võib Alamar Blue meetodit kasutada bakterite arvukuse hindamiseks, kuna see võimaldab hinnata bakterite arvukust ilma et oleks vaja rakendada tugevat sonikeerimist ja väristamist biofilmi lõhkumiseks.

## 2.4. Arutelu

Dissolutesiti järgi vabastavad PCL ja PCL/PEO nanofiibermatid väga erinevalt antibiootikumi, kuid antimikroobsuses pole suurt erinevust (Preem *et al.*, 2017). Kõigepealt uuriti raviaine vabanemist ajas bioreporterit abil. Sellest katsest on reporterit abil näha, et PCL/PEO/CAM nanofiibermatist on klooramfenikooli maksimaalne kontsentratsioon matist kaugemal kui PCL/CAM nanofiibermati korral, mis tõestab, et PCL/PEO nanofiibermatt vabastab antibiootikumi kiiremini. See korreleerub varasemate tulemustega ning selle põhjuseks on mati hüdrofiilsus (Preem *et al.*, 2017). Vahe on suurem kolmandal tunnil (1,4 mm) võrreldes

kuuenda ajapunktiga (1,1 mm). Erinevused kahe nanofiibermati antimikroobse toime vahel ei ole bioreporterite katse põhjal siiski väga suured. Farmakopöa standardi, dissolutesi korral on klooramfenikooli vabanemise kiirus kasutatud nanofiibrite korral väga erinev, kuid need dissolutesid ei jäljenda olukorda haavas. Seetõttu ongi vaja luua haavale sarnasemaid mudeleid, et hinnata raviaine vabanemist nanofiibermatist ning selle toimet.

Infektsioonimudeli katsest on näha, et klooramfenikooli sisaldavad nanofiibermatid pärssivad bakterite arvukust ehk loodavad nanofiibrist haavakatted on antibakteriaalse toimega. Samuti on mõningane antimikroobne toime haavakatetel mudelraviaineta (Joonis 7). Antibiootikumi juuresolekul on näha, et *E. coli* ja *S. epidermidis* alluvad paremini mudelraviainele, kasvu on tuvastatud väga vähesel määral, seevastu *S. aureus*-e proovide korral on bakterite arvukus suurem ning ka kõikumine arvukuses on suurem. Sellele vaatama võib väita, et klooramfenikooli sisaldavad nanofiibermatid mõjuvad bakterite kasvule negatiivselt. Samuti saab väita, et just klooramfenikool pärssis bakterite kasvu, mitte nanofiibermat ise, sest raviaineta proovides on bakterite arvukus mitu korda suurem kui antibiootikumiga proovides.

Veel on näha, et langeb bakterite arvukus ajas raviaineta proovides. See võib tuleneda sellest, et hilisemateks ajapunktideks on saabunud küllastumus bakterite kasvus. Selleks, et bakterite kasv ei pidurduks ega hakkaks langema võiks söödet näiteks iga 24 h tagant uuendada.

Võrreldes *in vitro* ja *ex vivo* mudeleid ei ole märgata kindlat trendi bakterite arvukuse erinevuses - pole vahet, kas kasutada substraadina želatiini või seanahka. Seanaha kontrollis kasvas enamasti rohkem baktereid kui želatiini kontrollis, selle põhjuseks võib olla, et seanahal on bakterite jaoks sobivam keskkond lisatoitainete näol kasvamiseks ja paljunemiseks.

Seanaha kasutamise kahjuks võiks välja tuua steriilsusprobleemi. Korduvate katsete tegemise vajadus sõltus just enamasti seanahast, sest see oli pidevalt saastunud. Ka pärast  $\gamma$ -kiiritamist jäid tõenäoliselt ellu seanahal olnud spoorid, mis hakkasid katse käigus taas kasvama. Puhtamate seanaha-proovide jaoks võiks proovida enne steriilimist selle pesemist jooksva vee all seebiga. Samuti võib mainida, et seanaha proove on keerukam ette valmistada ja saada ühetaolisteks, sest kõrvast saadud nahaproovid on erineva paksusega. Mõned neist olid õhemad, teised paksemad. Ka sellest võis tulla tulemuste varieeruvus. Želatiini fiibermattide tükid olid peaaegu alati ühetaolised, vaid mõnes proovis võisid olla õhemad, kui lõigata need välja elektrosplintitud nanofiibermati äärest. Samuti on lihtsam töötada želatiini nanofiibritega, kuna materjal on lihtsasti kättesaadav, odav, võrdlemisi lihtne spinnida ning hoolikalt käsitledes ei ole see saastunud.

Nende kahe mudeli, *in vitro* želatiiniga ja *ex vivo* seanahaga, abil ei ole võimalik tuvastada kahe erineva toimeaine vabanemisprofiiliga elektrosprotsitud nanofiibermattide, PCL/CAM ja PCL/PEO/CAM, vahelisi erinevusi. See tuleneb sellest, et nimetatud nanofiibermatid vabastavad suure koguse raviainet (19-95%) esimese tunni jooksul pärast kasutuselevõttu (Preem *et al.*, 2017). Küll aga on võimalik testida nende mudelitega mudelraviaine mõju bakterite arvukusele.

Katsetest selgus, et bakterite arvukuse hindamiseks Alamar Blue indikaatori abil sobib nii 6 kui 24 tunni ajapunkt (Joonis 9). Edasi peaks tegema katseid ka seanahaga ning antibiootikumi sisaldava nanofiibermatiga. Üldiselt võib öelda, et Alamar Blue indikaatorit võib kasutada taoliste mudelite korral bakterite arvukuse hindamisel.

Samas ei asenda *in vitro* süsteemid lõplikult päris haavakatseid, sest nahk ei ole steriilne, seal elab palju erinevaid liike mikroobe, mis mõjutavad haavakatte testimist ja haava paranemist ning samuti on oluline roll haava paranemisel immuunsüsteemil.

Dissolutesid on näidanud, et elektrosprotsitud PCL ja PCL/PEO nanofiibermatid vabastavad erinevalt raviainet ning eelduste kohaselt ka tapavad baktereid seejuures erinevalt. Kuid katsed on näidanud, et hindamaks, kas üks materjal on parem kui teine, on vaja siiski tunduvalt elulähedasemaid katsesüsteeme. Tuleb veel kombineerida erinevaid võimalusi ning teadmisi, et luua katsesüsteem, mis haavaravi jaoks arendatavate materjalide testimiseks sobiks.

## KOKKUVÕTE

Käesoleva töö eesmärgiks oli võrrelda antibiootikumi sisaldava elektrosppinnitud PCL ja PCL/PEO nanofiibermati antimikroobseid omadusi. Taoliste uudsetele haavakatetele puuduvad farmakopöas juhised testimiseks.

Antud töös testiti elektrosppinnitud PCL ja PCL/PEO haavakatteid kõigepealt bioreporteriga, seejärel *in vitro* ja *ex vivo* mudeliga ning viimasena hinnati bakterite arvukust Alamar Blue indikaatorvärvi abil.

Bioreporter katse kahe fluorestseeruva valguga, kus kontrollvalku ekspresseeriti pidevalt ning reportervalgu vaid klooramfenikooli subinhibitoorsete kontsentratsioonide korral, näitas PCL/PEO/CAM kiiremat antibiootikumi vabastamist nanofiibermatist võrreldes PCL/CAM nanofiibermatiga. See tuleneb PCL/PEO nanofiibri hüdrofoobsusest. Inhibitsiooniraadiuse vahe kahe erineva nanofiibermati vahel kolmandal ja kuuendal tunnil pärast nanofiibermattide lisamist oli vastavalt 1,4 mm ja 1,1 mm ehk mitte väga suur, erinevalt varasemates katsetes näidatud suurtest erinevustest.

Töö järgmises etapis uuriti, kuidas see võiks toimuda haavas. Hinnati bakterite arvukust 24 tunni ja 48 tunni jooksul. Selleks konstrueeriti *in vitro* mudel elektrosppinnitud želatiiniga ning *ex vivo* mudel seakõrva nahaga. Mudeleid testiti kolme erineva patogeense bakteriga - *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ja *Staphylococcus epidermidis*-ega. Želatiini ja seanaha mudeli vahel silmnähtavaid erinevusi ei olnud. Lisaks toodi välja seakõrva kasutamise negatiivseid aspekte, näiteks saastus ning ebaühtlane proovi kvaliteet. Ka selle katsega ei olnud näha erilist vahet PCL ja PCL/PEO nanofiibri vahel.

Viimases osas testiti raviaineta nanofiibermatte *in vitro* infektsioonimudeliga, et hinnata teisel meetodil bakterite arvukust ja võrrelda neid infektsioonimudeli katse tulemustega. Katse Alamar Blue värviga sooritati *E. coli*-ga 6 ja 24 tunni jooksul. Tulemused olid sarnased infektsioonimudeli tulemustega ja seega sobib Alamar Blue bakterite arvukuse hindamisel alternatiivse meetodina.

# SUMMARY

## ***In vitro* testing of electrospun antimicrobial PCL and PCL/PEO nanofiber matrices**

Kadi Sagor

### Summary

The misuse and overuse of antibiotics has led to an increase in resistance of pathogenic bacteria. To reduce resistance it is important to optimize antibiotic use and educate people about the dangers of misuse.

Multiple methods are available for administration of antibiotics, mainly divided by administration route as systemic and local. Local administration can be used when systemic action is not necessary. Local administration achieves higher antibiotic concentration within the infection site while systemic concentration, and therefore risk of off-target effects, remains lower.

Electrospinning is gaining attention in biomedicine. It allows to produce materials with various properties. For example, matrices promoting recovery of damaged tissues can be created, as well as wound dressings delivering antibiotics. Wound dressing should be antimicrobial, biocompatible, easily removable and they should retain humidity. These and many other properties can be controlled by electrospinning.

There is currently a lack of protocols in pharmacopoeia for testing such wound dressings. Standard methods are very different from real infection conditions, such as a wound infection. Often testing of such pharmaceutical preparations is carried out in *in vivo* infection models, which are expensive and have several ethical issues. Simple *in vitro* and *ex vivo* models could substitute initial experiments on animals. Electrospun PCL and PCL/PEO wound dressings containing chloramphenicol are tested in this study first by using bioreporters and then in *in vitro* and *ex vivo* models. Bacteria were also quantified using Alamar Blue dye.

PCL/PEO/CAM nanofiber mat showed faster release of chloramphenicol than PCL/CAM in an experiment using a bioreporter with two fluorescent proteins, a constitutive control protein and a CAM-induced reporter protein. This is due to the hydrophobic property of PCL/PEO/CAM mat. The differences in inhibition radius were small between the two nanofiber mats.



As the next step, release of antibiotic from a nanofiber mat in a wound-like environment was studied. Bacteria were quantified at 24 and 48 hours. *In vitro* model with electrospun gelatine and *ex vivo* model with pig ear skin was carried out. The models were tested with three strains: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Staphylococcus epidermidis*. The two models displayed no clear differences. Negative aspects of using pig skin were discussed, including contamination and sample quality variation. The experiment displayed no clear difference between PCL and PCL/PEO nanofiber mats.

In the last part, nanofiber mats were tested without drugs to quantify bacteria using another method for comparison with the wound model experiment. Alamar Blue was used to quantify *E. coli* at 6 and 24 hours. The results were similar to wound model experiment.

In conclusion, in future, gelatine is suitable for such *in vitro* experiments, as the use of pig skin is not justified. Based on the experiments, it cannot be concluded that the drug release kinetics from the two nanofiber mats are significantly different during infection treatment.

## KIRJANDUSE LOETELU

- Ahn, Y. C., Park, S. K., Kim, G. T., Hwang, Y. J., Lee, C. G., Shin, H. S., & Lee, J. K. (2006). Development of high efficiency nanofilters made of nanofibers. *Current Applied Physics*, 6(6), 1030–1035. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2005.07.013>
- Albritton, A., Leonard, D. A., Barone, A. L., Keegan, J., Mallard, C., Sachs, D. H., Kurtz, J. M., & Cetrulo, C. L. J. (2014). Lack of Cross-Sensitization Between  $\alpha$ -1,3-Galactosyltransferase Knockout Porcine and Allogeneic Skin Grafts Permits Serial Grafting. *Transplantation*, 97(12), 1209–1215. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000000093>
- Asghari, S., Logsetty, S., & Liu, S. (2016). Imparting commercial antimicrobial dressings with low-adherence to burn wounds. *Burns*, 42(4), 877–883. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.01.005>
- Bahamondez-Canas, T. F., Heersema, L. A., & Smyth, H. D. C. (2019). Current Status of In Vitro Models and Assays for Susceptibility Testing for Wound Biofilm Infections. *Biomedicines*, 7(2). <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020034>
- Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., ... Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Belkin, S. (2003). Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 206–212. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00059-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00059-6)
- Bergogne-Bérézin, E., & Bryskier, A. (1999). The suppository form of antibiotic administration: pharmacokinetics and clinical application. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43(2), 177–185. <https://doi.org/10.1093/jac/43.2.177>
- Berri, N., Fares, J., & Fares, Y. (2018). Polyethylene Oxide and Silicon-Substituted Hydroxyapatite Composite: A Biomaterial for Hard Tissue Engineering in Orthopedic

- and Spine Surgery. *Advanced Biomedical Research*, 7.  
[https://doi.org/10.4103/abr.abr\\_206\\_17](https://doi.org/10.4103/abr.abr_206_17)
- Bessa, L. J., Fazii, P., Giulio, M. D., & Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, 12(1), 47–52.  
<https://doi.org/10.1111/iwj.12049>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- Bhattarai, R. S., Bachu, R. D., Boddu, S. H. S., & Bhaduri, S. (2018). Biomedical Applications of Electrospun Nanofibers: Drug and Nanoparticle Delivery. *Pharmaceutics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11010005>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., & Wright, G. D. (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*, 7(4).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462.
- Bowler, P. G., & Parsons, D. (2016). Combatting wound biofilm and recalcitrance with a novel anti-biofilm Hydrofiber® wound dressing. *Wound Medicine*, 14, 6–11.  
<https://doi.org/10.1016/j.wndm.2016.05.005>
- Boy-Roura, M., Mas-Pla, J., Petrovic, M., Gros, M., Soler, D., Brusi, D., & Menció, A. (2018). Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain). *Science of The Total Environment*, 612, 1387–1406.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.012>

- Bradshaw, C. E. (2011). An in vitro comparison of the antimicrobial activity of honey, iodine and silver wound dressings. *Bioscience Horizons: The International Journal of Student Research*, 4(1), 61–70. <https://doi.org/10.1093/biohorizons/hzr008>
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.006>
- Broussard, K. C., & Powers, J. G. (2013). Wound Dressings: Selecting the Most Appropriate Type. *American Journal of Clinical Dermatology*, 14(6), 449–459. <https://doi.org/10.1007/s40257-013-0046-4>
- Burgess, K., Li, H., Abo-zeid, Y., Fatimah, & Williams, G. R. (2018). The Effect of Molecular Properties on Active Ingredient Release from Electrospun Eudragit Fibers. *Pharmaceutics*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10030103>
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771–1776.
- Corona, F., & Martinez, J. L. (2013). Phenotypic Resistance to Antibiotics. *Antibiotics*, 2(2), 237–255. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020237>
- Dai, T., Duan, J., Li, X., Xu, X., Shi, H., & Kang, W. (2017). Determination of Sulfonamide Residues in Food by Capillary Zone Electrophoresis with On-Line Chemiluminescence Detection Based on an Ag(III) Complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061286>
- Davis, S. C., Li, J., Gil, J., Valdes, J., Solis, M., Higa, A., & Bowler, P. (2018). The wound-healing effects of a next-generation anti-biofilm silver Hydrofiber wound dressing on deep partial-thickness wounds using a porcine model. *International Wound Journal*, 15(5), 834–839. <https://doi.org/10.1111/iwj.12935>

- Eskitoros-Togay, Ş. M., Bulbul, Y. E., & Dilsiz, N. (2018). Quercetin-loaded and unloaded electrospun membranes: Synthesis, characterization and in vitro release study. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 47, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.06.017>
- Eskitoros-Togay, Ş. M., Bulbul, Y. E., Tort, S., Demirtaş Korkmaz, F., Acartürk, F., & Dilsiz, N. (2019). Fabrication of doxycycline-loaded electrospun PCL/PEO membranes for a potential drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 565, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.073>
- European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, (2018). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016*.
- File, T. M., Mandell, L. A., Tillotson, G., Kostov, K., & Georgiev, O. (2007). Gemifloxacin once daily for 5 days versus 7 days for the treatment of community-acquired pneumonia: a randomized, multicentre, double-blind study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 112–120. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm119>
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10(3), 226–236.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gould, I. M., & Bal, A. M. (2013). New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence*, 4(2), 185–191. <https://doi.org/10.4161/viru.22507>
- Griffith, L. G. (2000). Polymeric biomaterials. *Acta Materialia*, 48(1), 263–277. [https://doi.org/10.1016/S1359-6454\(99\)00299-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6454(99)00299-2)

- Guidos, R., J. (2011). Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 52(Suppl 5), S397–S428. <https://doi.org/10.1093/cid/cir153>
- Haider, A., Haider, S., & Kang, I.-K. (2018). A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry*, 11(8), 1165–1188. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.11.015>
- Haisma, E. M., Rietveld, M. H., de Breij, A., van Dissel, J. T., El Ghalbzouri, A., & Nibbering, P. H. (2013). Inflammatory and Antimicrobial Responses to Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in an In Vitro Wound Infection Model. *PLoS ONE*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082800>
- Halim, A. S., Khoo, T. L., & Mohd. Yussof, S. J. (2010). Biologic and synthetic skin substitutes: An overview. *Indian Journal of Plastic Surgery: Official Publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, 43(Suppl), S23–S28. <https://doi.org/10.4103/0970-0358.70712>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular Microbiology*, 11(7), 1034–1043. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>
- Harms, H., Wells, M. C., & van der Meer, J. R. (2006). Whole-cell living biosensors—are they ready for environmental application? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(3), 273–280. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0319-4>
- Hollis, A., & Ahmed, Z. (2013, December 25). *Preserving Antibiotics, Rationally* (world) [N-perspective]. [Http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMp1311479](http://Dx.Doi.Org/10.1056/NEJMp1311479); Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1311479>

- Hunley, M. T., & Long, T. E. (2008). Electrospinning functional nanoscale fibers: a perspective for the future. *Polymer International*, 57(3), 385–389. <https://doi.org/10.1002/pi.2320>
- Jahanshahi, M., Hamdi, D., Godau, B., ... Akbari, M. (2020). An Engineered Infected Epidermis Model for In Vitro Study of the Skin's Pro-Inflammatory Response. *Micromachines*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/mi11020227>
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P. T., Nair, S. V., & Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, 29(3), 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>
- Jensen, K. F. (1993). The Escherichia coli K-12 “wild types” W3110 and MG1655 have an rph frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low pyrE expression levels. *Journal of Bacteriology*, 175(11), 3401–3407.
- Jepsen, K., & Jepsen, S. (2016). Antibiotics/antimicrobials: systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology 2000*, 71(1), 82–112. <https://doi.org/10.1111/prd.12121>
- Ji, Y., Liang, K., Shen, X., & Bowlin, G. L. (2014). Electrospinning and characterization of chitin nanofibril/polycaprolactone nanocomposite fiber mats. *Carbohydrate Polymers*, 101, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.09.012>
- Kathuria, N., Tripathi, A., Kar, K. K., & Kumar, A. (2009). Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 5(1), 406–418. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.07.009>
- Khil, M.-S., Cha, D.-I., Kim, H.-Y., Kim, I.-S., & Bhattarai, N. (2003). Electrospun nanofibrous polyurethane membrane as wound dressing. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 67B(2), 675–679. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.10058>

- Khorvash, F., Abdi, F., H.Kashani, H., Fatemi Naeini, F., & Khorvash, F. (2013). Efficacy of Mupirocin and Rifampin Used with Standard Treatment in the Management of Acne Vulgaris. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 12(1), 223–227.
- Kogermann, K. (2018). *Artikkel tutvustab praegusel ajal kasutusel olevaid üldiseid haavaravi põhimõtteid ning toob välja peamised tulevikusuunad, millega teaduses aktiivselt tegeletakse ja kuhu lähiajal loodetakse kliinilises praktikas jõuda*. 5.
- Korting, H., Schöllmann, C., & White, R. (2011). Management of minor acute cutaneous wounds: importance of wound healing in a moist environment. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(2), 130–137. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03775.x>
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, 7(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060180>
- Kurmi, B. D., Tekchandani, P., Paliwal, R., & Paliwal, S. R. (2017). Transdermal Drug Delivery: Opportunities and Challenges for Controlled Delivery of Therapeutic Agents Using Nanocarriers. *Current Drug Metabolism*, 18(5), 481–495. <https://doi.org/10.2174/1389200218666170222150555>
- Larsson, D. G. J., de Pedro, C., & Paxeus, N. (2007). Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 751–755. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.008>
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet. Infectious Diseases*, 13(12), 1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- Lazarus, G. S., Cooper, D. M., Knighton, D. R., Margolis, D. J., Pecoraro, R. E., Rodeheaver, G., & Robson, M. C. (1994). Definitions and guidelines for assessment of wounds and



- evaluation of healing. *Archives of Dermatology*, 130(4), 489–493.  
<https://doi.org/10.1001/archderm.130.4.489>
- Lee, S. W., Foley, E. J., & Epstein, J. A. (1944). Mode of Action of Penicillin. *Journal of Bacteriology*, 48(4), 393–399.
- Levin, B. R., & Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 556–562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1445>
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10(12), S122–S129. <https://doi.org/10.1038/nm1145>
- Li, Y.-F., Gregersen, H., Nygaard, J. V., Cheng, W., Yu, Y., Huang, Y., Dong, M., Besenbacher, F., & Chen, M. (2015). Ultraporous nanofeatured PCL–PEO microfibrous scaffolds enhance cell infiltration, colonization and myofibroblastic differentiation. *Nanoscale*, 7(36), 14989–14995. <https://doi.org/10.1039/C5NR04244E>
- MacDougall, C., & Polk, R. E. (2005). Antimicrobial Stewardship Programs in Health Care Systems. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 638–656.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.638-656.2005>
- MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature*, 445(7130), 874–880. <https://doi.org/10.1038/nature05664>
- Marson, B. A., Deshmukh, S. R., Grindlay, D. J. C., Ollivere, B. J., & Scammell, B. E. (2018). A systematic review of local antibiotic devices used to improve wound healing following the surgical management of foot infections in diabetics. *The Bone & Joint Journal*, 100-B(11), 1409–1415. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.100B11.BJJ-2018-0720>
- Matuschek, E., Brown, D. F. J., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), O255–O266.  
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>

- McClure, M. J., Sell, S. A., Simpson, D. G., Walpoth, B. H., & Bowlin, G. L. (2010). A three-layered electrospun matrix to mimic native arterial architecture using polycaprolactone, elastin, and collagen: A preliminary study. *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2422–2433. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.029>
- McLister, A., McHugh, J., Cundell, J., & Davis, J. (2016). New Developments in Smart Bandage Technologies for Wound Diagnostics. *Advanced Materials*, 28(27), 5732–5737. <https://doi.org/10.1002/adma.201504829>
- Meer, J. R. V. D., Tropel, D., & Jaspers, M. (2004). Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. *Environmental Microbiology*, 6(10), 1005–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00655.x>
- Melamed, S., Lalush, C., Elad, T., Yagur-Kroll, S., Belkin, S., & Pedahzur, R. (2012). A bacterial reporter panel for the detection and classification of antibiotic substances. *Microbial Biotechnology*, 5(4), 536–548. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00333.x>
- Melander, R. J., Zurawski, D. V., & Melander, C. (2017). Narrow-spectrum antibacterial agents. *MedChemComm*, 9(1), 12–21. <https://doi.org/10.1039/c7md00528h>
- Melo, L. D. R., Ferreira, R., Costa, A. R., Oliveira, H., & Azeredo, J. (2019). Efficacy and safety assessment of two enterococci phages in an in vitro biofilm wound model. *Scientific Reports*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43115-8>
- Méric, G., Mageiros, L., Pensar, J., ... Sheppard, S. K. (2018). Disease-associated genotypes of the commensal skin bacterium *Staphylococcus epidermidis*. *Nature Communications*, 9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07368-7>
- Minogue, T. D., Daligault, H. A., Davenport, K. W., ... Johnson, S. L. (2014). Complete Genome Assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a Serotype O6 Reference Strain. *Genome Announcements*, 2(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00969-14>

- Mokh, S., El Khatib, M., Koubar, M., Daher, Z., & Al Iskandarani, M. (2017). Innovative SPE-LC-MS/MS technique for the assessment of 63 pharmaceuticals and the detection of antibiotic-resistant-bacteria: A case study natural water sources in Lebanon. *Science of The Total Environment*, 609, 830–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.230>
- Møller Gundersen, K., Nygaard Jensen, J., Bjerrum, L., & Hansen, M. P. (2019). Short-course vs long-course antibiotic treatment for community-acquired pneumonia: A literature review. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 124(5), 550–559. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13205>
- Moser, C., Lerche, C. J., Thomsen, K., Hartvig, T., Schierbeck, J., Jensen, P. Ø., Ciofu, O., & Høiby, N. (2019). Antibiotic therapy as personalized medicine – general considerations and complicating factors. *APMIS*, 127(5), 361–371. <https://doi.org/10.1111/apm.12951>
- Munteanu, F.-D., Titoiu, A. M., Marty, J.-L., & Vasilescu, A. (2018). Detection of Antibiotics and Evaluation of Antibacterial Activity with Screen-Printed Electrodes. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/s18030901>
- Nagaoka, S., & Nakao, A. (1990). Clinical application of antithrombogenic hydrogel with long poly (ethylene oxide) chains. *Biomaterials*, 11(2), 119–121. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(90\)90126-B](https://doi.org/10.1016/0142-9612(90)90126-B)
- Neves, M. A. das, Silva, G. S. da, Brito, N. M., Araujo, K. C. M. de, Marques, E. P., & Silva, L. K. (2017). *Aqueous Ultrasound-Assisted Extraction for the Determination of Fluoroquinolones in Mangrove Sediment by High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detector*. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20170108>
- Nicholas J, A., Alejandro, A., Thomas, B., Edward, T. (2013). Human Health Risk Assessment (HHRA) for Environmental Development and Transfer of Antibiotic

- Resistance. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 993–1001.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1206316>
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
- Olofsson, S. K., & Cars, O. (2007). Optimizing Drug Exposure to Minimize Selection of Antibiotic Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 45(Supplement\_2), S129–S136.  
<https://doi.org/10.1086/519256>
- Pawlowski, A. C., Wang, W., Koteva, K., Barton, H. A., McArthur, A. G., & Wright, G. D. (2016). A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms13803>
- Percival, S. L., Bowler, P., & Woods, E. J. (2008). Assessing the effect of an antimicrobial wound dressing on biofilms. *Wound Repair and Regeneration*, 16(1), 52–57.  
<https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2007.00350.x>
- Percival, S. L., Hill, K. E., Williams, D. W., Hooper, S. J., Thomas, D. W., & Costerton, J. W. (2012). A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 20(5), 647–657. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2012.00836.x>
- Pérez, R. A., Albero, B., Ferriz, M., & Tadeo, J. L. (2017). Analysis of macrolide antibiotics in water by magnetic solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 146, 79–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.08.013>

- Perron, G. G., Whyte, L., Turnbaugh, P. J., Goordial, J., Hanage, W. P., Dantas, G., & Desai, M. M. (2015). Functional Characterization of Bacteria Isolated from Ancient Arctic Soil Exposes Diverse Resistance Mechanisms to Modern Antibiotics. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069533>
- Perry, J., Waglechner, N., & Wright, G. (2016). The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>
- Preem, L., Bock, F., Hinnu, M., Putrinš, M., Sagor, K., Tenson, T., Meos, A., Østergaard, J., & Kogermann, K. (2019). Monitoring of Antimicrobial Drug Chloramphenicol Release from Electrospun Nano- and Microfiber Mats Using UV Imaging and Bacterial Bioreporters. *Pharmaceutics*, *11*(9), 487. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11090487>
- Preem, L., Mahmoudzadeh, M., Putrinš, M., ... Kogermann, K. (2017). Interactions between Chloramphenicol, Carrier Polymers, and Bacteria—Implications for Designing Electrospun Drug Delivery Systems Countering Wound Infection. *Molecular Pharmaceutics*, *14*(12), 4417–4430. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00524>
- Preem, L., Vaarmets, E., Meos, A., Jõgi, I., Putrinš, M., Tenson, T., & Kogermann, K. (2019). Effects and efficacy of different sterilization and disinfection methods on electrospun drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, *567*, 118450. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118450>
- Queen, D., Orsted, H., Sanada, H., & Sussman, G. (2004). A dressing history. *International Wound Journal*, *1*(1), 59–77. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4801.2004.0009.x>
- Radisavljevic, A., Stojanovic, D. B., Perisic, S., Djokic, V., Radojevic, V., Rajilic-Stojanovic, M., & Uskokovic, P. S. (2018). Cefazolin-loaded polycaprolactone fibers produced via different electrospinning methods: Characterization, drug release and antibacterial

- effect. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 124, 26–36.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.08.023>
- Reneker, D. H., & Yarin, A. L. (2008). Electrospinning jets and polymer nanofibers. *Polymer*, 49(10), 2387–2425. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2008.02.002>
- Rheinecker, S. B. (1995). Wound Management: The Occlusive Dressing. *Journal of Athletic Training*, 30(2), 143–146.
- Roointan, A., Shabab, N., Karimi, J., Rahmani, A., Alikhani, M., & Saidijam, M. (2015). Designing a bacterial biosensor for detection of mercury in water solutions. *TURKISH JOURNAL OF BIOLOGY, Turk J Biol*, 550–555. <https://doi.org/10.3906/biy-1411-49>
- Rubert, M., Dehli, J., Li, Y.-F., Berat Taskin, M., Xu, R., Besenbacher, F., & Chen, M. (2014). Electrospun PCL/PEO coaxial fibers for basic fibroblast growth factor delivery. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8538–8546.  
<https://doi.org/10.1039/C4TB01258E>
- Rubinchik, E., & Pasetka, C. (2010). Ex Vivo Skin Infection Model. In A. Giuliani & A. C. Rinaldi (Eds.), *Antimicrobial Peptides: Methods and Protocols* (pp. 359–369). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-594-1_22)
- Sagor, K. (2018). *Fluorestsentsil põhineva bioreporterite konstrueerimine valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide detekteerimiseks bakteris Escherichia coli* [Thesis, Tartu Ülikool]. <https://dspace.ut.ee/handle/10062/61481>
- Sawicka, K., Gouma, P., & Simon, S. (2005). Electrospun biocomposite nanofibers for urea biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 108(1), 585–588.  
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.12.013>
- Schaudinn, C., Dittmann, C., Jurisch, J., Laue, M., Günday-Türel, N., Blume-Peytavi, U., Vogt, A., & Rancan, F. (2017). Development, standardization and testing of a bacterial wound infection model based on ex vivo human skin. *PLoS ONE*, 12(11).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186946>

- Seal, B. L., Otero, T. C., & Panitch, A. (2001). Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 34(4), 147–230. [https://doi.org/10.1016/S0927-796X\(01\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0927-796X(01)00035-3)
- Sen, C. K., Gordillo, G. M., Roy, S., Kirsner, R., Lambert, L., Hunt, T. K., Gottrup, F., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2009). Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy. *Wound Repair and Regeneration*, 17(6), 763–771. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x>
- Setooni, Z., Mohammadi, M., Hashemi, A., Hashemi, M., Mozafari, F., Simi, F., Bargahi, A., Daneshi, A., Hajiani-E-Asl, M. R., & Farzadinia, P. (2018). Evaluation of Wound Dressing Made From Spider Silk Protein Using in a Rabbit Model. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 17(2), 71–77. <https://doi.org/10.1177/1534734618782827>
- Siddiqui, A. R., & Bernstein, J. M. (2010). Chronic wound infection: Facts and controversies. *Clinics in Dermatology*, 28(5), 519–526. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2010.03.009>
- Sill, T. J., & von Recum, H. A. (2008). Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.01.011>
- Soni, I., Chakrapani, H., & Chopra, S. (2015). Draft Genome Sequence of Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. *Genome Announcements*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/genomeA.01095-15>
- Spellberg, B. (2016). The New Antibiotic Mantra—“Shorter Is Better.” *JAMA Internal Medicine*, 176(9), 1254–1255. <https://doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.3646>
- Sriram, G., Alberti, M., Dancik, Y., Wu, B., Wu, R., Feng, Z., Ramasamy, S., Bigliardi, P. L., Bigliardi-Qi, M., & Wang, Z. (2018). Full-thickness human skin-on-chip with

- enhanced epidermal morphogenesis and barrier function. *Materials Today*, 21(4), 326–340. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.11.002>
- Sun, Yan, Dowd, S. E., Smith, E., Rhoads, D. D., & Wolcott, R. D. (2008). In vitro multispecies Lubbock chronic wound biofilm model. *Wound Repair and Regeneration*, 16(6), 805–813. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00434.x>
- Sun, Yanwen, Connor, M. G., Pennington, J. M., & Lawrenz, M. B. (2012). Development of Bioluminescent Bioreporters for In Vitro and In Vivo Tracking of *Yersinia pestis*. *PLOS ONE*, 7(10), e47123. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047123>
- Thorn, R. M. S., & Greenman, J. (2009). A novel in vitro flat-bed perfusion biofilm model for determining the potential antimicrobial efficacy of topical wound treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 107(6), 2070–2079. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04398.x>
- Thorn, R. M. S., Greenman, J., & Austin, A. J. (2005). In vitro method to assess the antimicrobial activity and potential efficacy of novel types of wound dressings. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 895–901. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02671.x>
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649–5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- van der Meer, J. R., & Belkin, S. (2010). Where microbiology meets microengineering: design and applications of reporter bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 8(7), 511–522. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2392>
- Wang, C.-H., Chang, S.-J., Tzeng, Y.-S., Shih, Y.-J., Adrienne, C., Chen, S.-G., Chen, T.-M., Dai, N.-T., & Cherng, J.-H. (2017). Enhanced wound-healing performance of a phyto-



- polysaccharide-enriched dressing – a preclinical small and large animal study. *International Wound Journal*, 14(6), 1359–1369. <https://doi.org/10.1111/iwj.12813>
- Wang, W., Zhang, L., Tong, S., Li, X., & Song, W. (2009). Three-dimensional network films of electrospun copper oxide nanofibers for glucose determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 25(4), 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.013>
- Wang, X., Li, Z., Li, B., ... Xia, Z. (2016). Bioluminescence Imaging of Colonization and Clearance Dynamics of *Brucella Suis* Vaccine Strain S2 in Mice and Guinea Pigs. *Molecular Imaging and Biology*, 18(4), 519–526. <https://doi.org/10.1007/s11307-015-0925-6>
- Wang, Y., Gan, N., Zhou, Y., Li, T., Hu, F., Cao, Y., & Chen, Y. (2017). Novel label-free and high-throughput microchip electrophoresis platform for multiplex antibiotic residues detection based on aptamer probes and target catalyzed hairpin assembly for signal amplification. *Biosensors and Bioelectronics*, 97, 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.05.017>
- Weng, L., & Xie, J. (2015). Smart Electrospun Nanofibers for Controlled Drug Release: Recent Advances and New Perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 21(15), 1944–1959.
- Werthén, M., Henriksson, L., Jensen, P. Ø., Sternberg, C., Givskov, M., & Bjarnsholt, T. (2010). An in vitro model of bacterial infections in wounds and other soft tissues. *APMIS*, 118(2), 156–164. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2009.02580.x>
- Wiechula, R. (2003). The use of moist wound-healing dressings in the management of split-thickness skin graft donor sites: a systematic review. *International Journal of Nursing Practice*, 9(2), S9–S17. <https://doi.org/10.1046/j.1322-7114.2003.00417.x>
- Wilson, H. L., Daveson, K., & Del Mar, C. B. (2019). Optimal antimicrobial duration for common bacterial infections. *Australian Prescriber*, 42(1), 5–9. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2019.001>

- Wise, R. (2002). Antimicrobial resistance: priorities for action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 585–586. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585>
- Woodruff, M. A., & Hutmacher, D. W. (2010). The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 35(10), 1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>
- Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0083>
- Wufuer, M., Lee, G., Hur, W., Jeon, B., Kim, B. J., Choi, T. H., & Lee, S. (2016). Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment. *Scientific Reports*, 6(1), 37471. <https://doi.org/10.1038/srep37471>
- Xu, T., Close, D. M., Sayler, G. S., & Ripp, S. (2013). Genetically modified whole-cell bioreporters for environmental assessment. *Ecological Indicators*, 28, 125–141. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.01.020>
- Yilmaz, Ç., & Özcengiz, G. (2017). Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. *Biochemical Pharmacology*, 133, 43–62. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.005>
- Zhang, N., Deng, Y., Tai, Q., ... Zhao, X.-Z. (2012). Electrospun TiO<sub>2</sub> Nanofiber-Based Cell Capture Assay for Detecting Circulating Tumor Cells from Colorectal and Gastric Cancer Patients. *Advanced Materials*, 24(20), 2756–2760. <https://doi.org/10.1002/adma.201200155>
- Zhao, T., Chen, L.-A., Wang, P., ... Liu, Y. (2016). A randomized, open, multicenter clinical study on the short course of intravenous infusion of 750 mg of levofloxacin and the sequential standard course of intravenous infusion/oral administration of 500 mg of

levofloxacin for treatment of community-acquired pneumonia. *Journal of Thoracic Disease*, 8(9), 2473–2484. <https://doi.org/10.21037/jtd.2016.08.30>

Zhou, Y., Yang, D., Chen, X., Xu, Q., Lu, F., & Nie, J. (2008). Electrospun Water-Soluble Carboxyethyl Chitosan/Poly(vinyl alcohol) Nanofibrous Membrane as Potential Wound Dressing for Skin Regeneration. *Biomacromolecules*, 9(1), 349–354. <https://doi.org/10.1021/bm7009015>

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

*DH5-Alpha E. coli - microbewiki.* Külastuse kuupäev 16.03.2020  
[https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha\\_E.coli](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/DH5-Alpha_E.coli)

*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details.* (a). Külastuse kuupäev 01.04.2020 <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/dsm-1103>

*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details.* (b). Külastuse kuupäev 01.04.2020 <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2569>

*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: Details.* (c). Külastuse kuupäev 05.05.2020 <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-28319>

*Should We Continue to Feed Antibiotics to Livestock?* (13.02.2015). National Geographic News. Külastuse kuupäev 22.04.2020  
<https://www.nationalgeographic.com/news/2015/02/150213-antibiotic-resistance-animals-ngfood/>

*Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin.* (1945). Külastuse kuupäev 07.04.2020  
[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.html)

*Ravimiregister.* Külastuse kuupäev 07.05.2020  
<https://www.ravimiregister.ee/?pv=HumRavimid.ATCPuu&ot=&l=et#S>

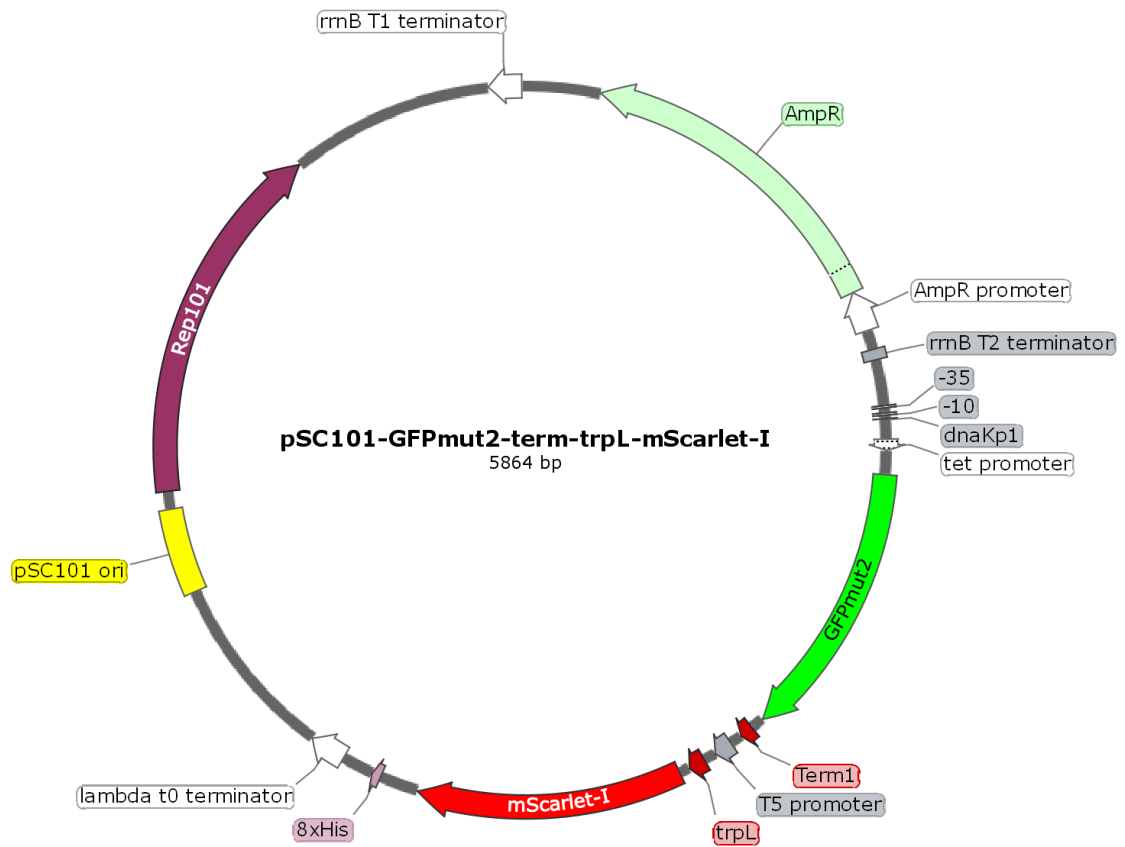
# LISA 1

**Tabel 4. Töös kasutatud söötmed ja kemikaalid.**

	<b>Firma</b>	<b>Partii number</b>
<b>LB Broth</b>	DB Difco™	7009600
<b>DMEM/F-12 Ham</b>	Sigma-Aldrich	RNBH2975
<b>FBS</b>	Sigma-Aldrich	
<b>CAM</b>	Sigma-Aldrich	
<b>AMP</b>	Sandoz	CP3091
<b>Alamar Blue</b>	Bio-Rad	152261
<b>PCL</b>	Sigma-Aldrich	MKBX1062V
<b>PEO</b>	Sigma-Aldrich	MKCG0714
<b>Želatiin</b>	Sigma-Aldrich	SLBL7508V
<b>Glükoos</b>	Sigma-Aldrich	SLBM4502V

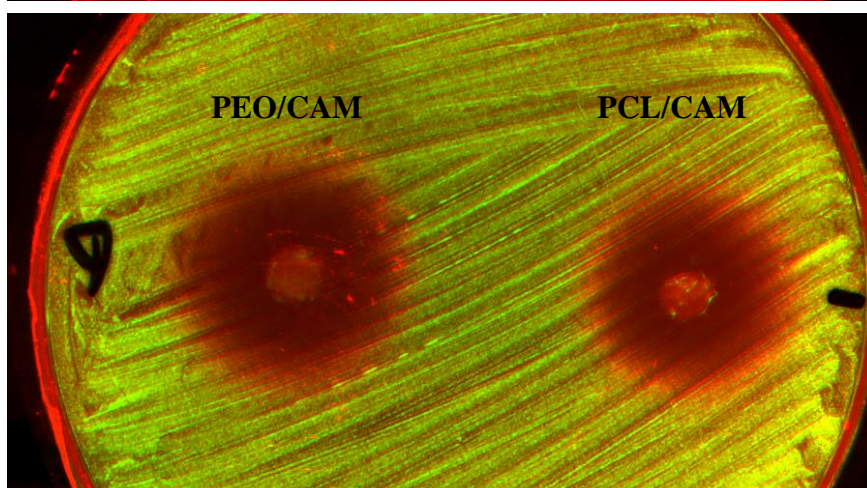
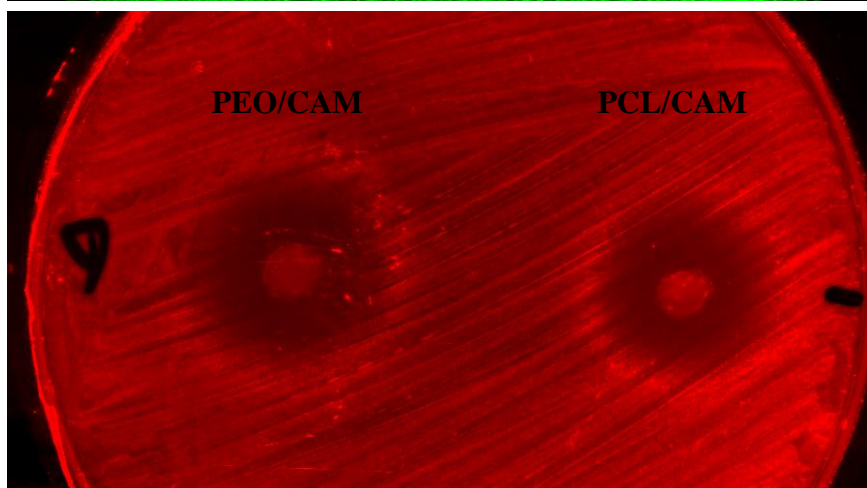
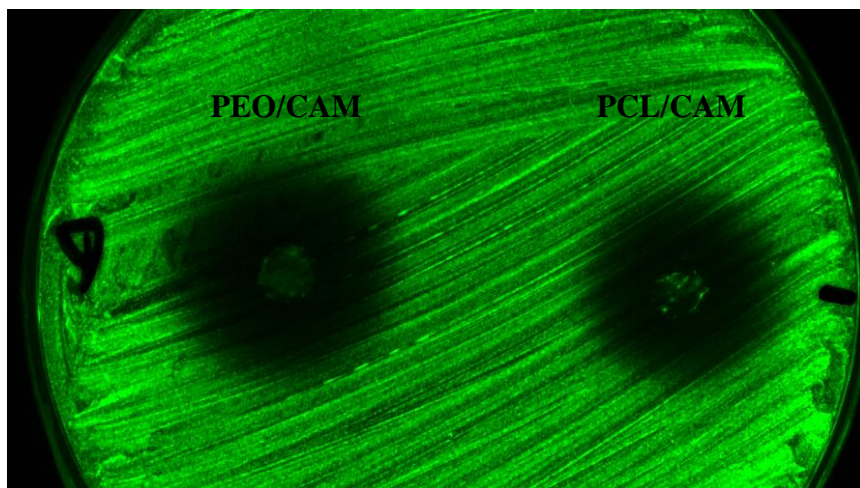
## LISA 2

Bioreporter plasmidkaart.

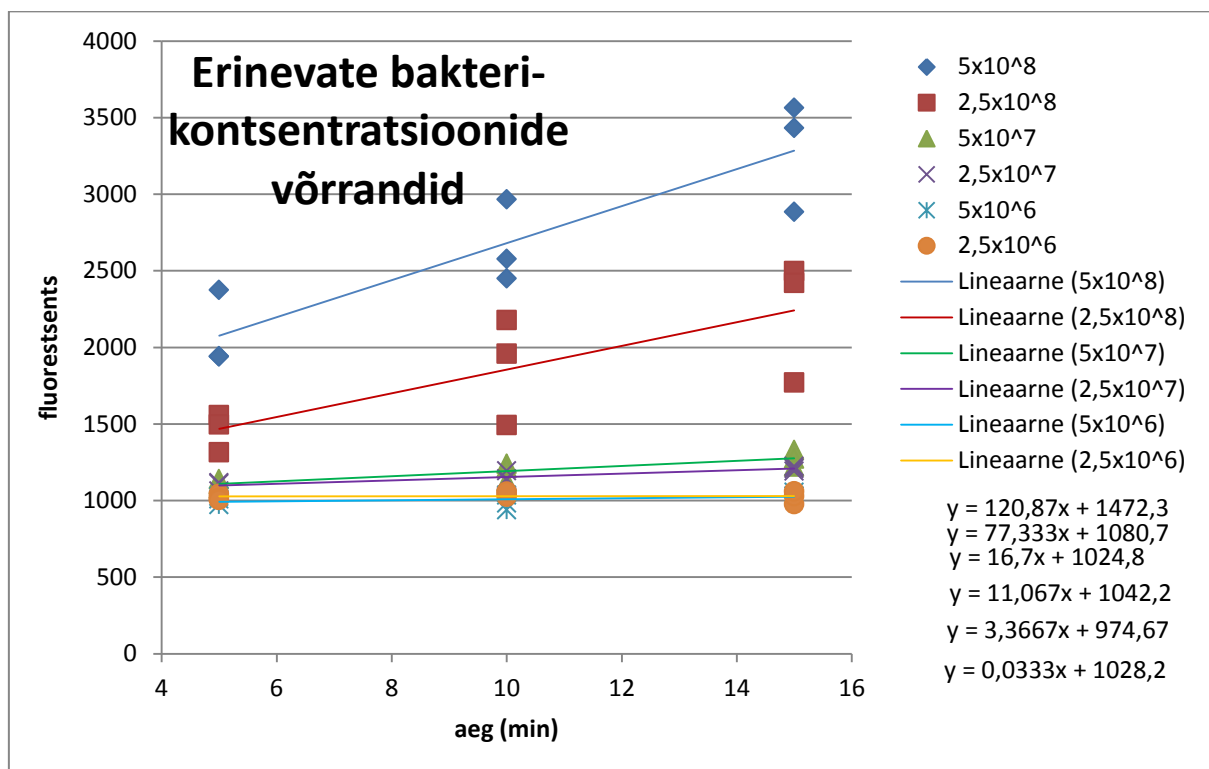


### LISA 3

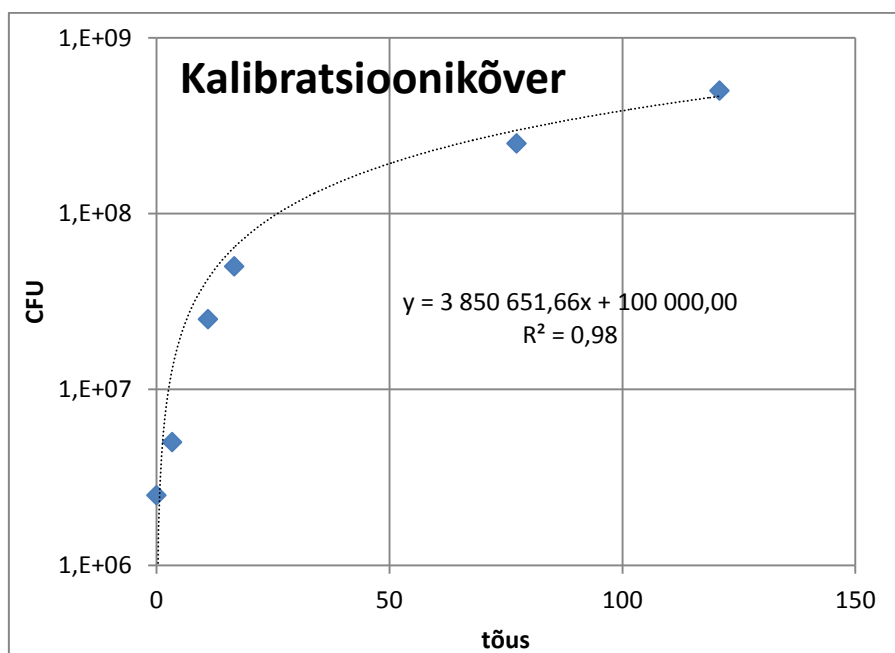
Bioreporteri katse skanneering ühest kordusest 6. ajatunnil. Roheline fluorestsentskanal, punane fluorestsentskanal ning mõlemad fluorestsentskanalid ülekattes.



## LISA 4



Joonis 10. Kalibratsioonisirge arvutamiseks leitud kontsentratsioonide võrrandid Alamar Blue katses.



Joonis 11. Kalibratsioonikõver koos võrrandiga Alamar Blue katse jaoks.



# LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Kadi Sagor,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „**Elektrospinnitud antimikroobsete PCL ja PCL/PEO nanofiibermattide *in vitro* testimine**“, mille juhendajad on Mariliis Hinno, Kairi Tiirik ja Marta Putrinš reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Kadi Sagor*

**11.06.2020**